



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*

Discipline ou spécialité : *Génie des Procédés*

Présentée et soutenue par *Jérôme Roche*

Le *18 Janvier 2011*

Titre : *Régénération continue du cofacteur NADH catalysée par la formate déshydrogénase immobilisée en réacteur filtre-pressé*

JURY

R. Ferrigno, Professeur à l'Université Lyon 1 (Rapporteur)

B. Limoges, Directeur de Recherche au Laboratoire d'Electrochimie Moléculaire, Université Paris 7 (Rapporteur)

K. Servat, Maître de Conférences à l'Université de Poitiers (Examineur)

T. Tzedakis, Professeur à l'Université Toulouse III - Paul Sabatier (Examineur)

K. Groenen Serrano, Maître de Conférences à l'Université Toulouse III (Examineur)

O. Reynes, Maître de Conférences à l'Université Toulouse III - Paul Sabatier (Examineur)

Ecole doctorale : *MEGeP*

Unité de recherche : *Laboratoire de Génie Chimique UMR 5503 Toulouse*

Directeur(s) de Thèse : *K. Groenen Serrano*

Rapporteurs : *R. Ferrigno; B. Limoges*

A mon père,

*« Tout est changement, non pour ne plus être mais pour devenir
ce qui n'est pas encore »*

Epictète

Remerciements

Je tiens à adresser mes remerciements à Pierre Aimar pour m'avoir accueilli au sein du Laboratoire de Génie Chimique, sur le site de l'Université Paul Sabatier. Un grand merci également à mes directeurs de thèse dont la compétence, la disponibilité et la bonne humeur ont rendu ces trois années très agréables. Merci à Karine Serrano pour son soutien moral dans les moments difficiles, merci à Olivier Reynes, à la bonne humeur proverbiale, pour les quelques boutades que nous avons eu l'occasion de partager (la blague de la falaise, juste inoubliable). Je remercie tout particulièrement Théodore Tzedakis pour m'avoir fait confiance dès le master en m'accueillant en stage et pour m'avoir transmis le goût de la recherche et particulièrement de l'électrochimie.

Merci à Benoît Limoges et à Rosaria Ferrigno d'avoir pris le temps de juger ce travail. Leurs remarques, toujours dans un esprit constructif, ont été à la fois utiles et encourageantes. Merci également à Karine Servat pour ses corrections et ses précisions sur le manuscrit.

Je remercie également tout le personnel du Laboratoire de Génie Chimique, à la fois pour leurs attentions souvent indispensables, et pour leurs qualités humaines toujours évidentes. Un merci tout particulier aux doctorants de l'équipe Réacteurs et Catalyse (Dancheng Chen, Charlotte Racaud, Raluca Mihalea Ciumag, Yves Assouan et Cyril « Tata » Renault) d'avoir supporté mon humeur pour le moins variable pendant les quelques mois de rédaction de ce manuscrit. Une mention spéciale pour Dancheng et Charlotte pour nous avoir régallées de ses sushis pour l'une et de ses gâteaux pour l'autre. Je leur souhaite bon courage et bonne chance pour la suite de leur thèse.

D'un point de vue plus personnel, je remercie ma famille pour sa confiance toujours renouvelée et son soutien indéfectible. Je souhaite bon courage à mon petit frère, Olivier, pour la suite de ses études aux Beaux Arts. Je suis fier de le voir poursuivre sa vocation avec talent et passion.

Enfin, merci à mes amis sans qui rien n'aurait été possible. Bravo au « club des cinq » doctorants dont les aventures sur les paillasses Toulousaines m'ont aidé à prendre du recul sur mon propre travail : Stéphanie « Poulpos », Olivier « Tonton » Viking, Cyril « Tata » Renault, Arno les bons tuyaux. Nous nous connaissions avant la thèse, et après 10 ans d'amitié, j'ai maintenant la certitude que nous ne nous perdrons jamais de vue. Je ne peux également oublier de citer (en vrac et dans le désordre) : Mary « el stomacho », Phiphine la maline, David l'autre, Big Fredo, Goofa, Noémie Jolie, Petonge Nosoul et Aude Alamour, Rockito, Batak et Chloé, Gadolinium et Rémi Fasol.

Avant-Propos

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une allocation de recherche attribuée par le Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche et a donné lieu aux communications et publications suivantes :

Communications orales:

“Réduction de la Flavine Adénine Dinucléotide sur électrode d'or”, Roche, J., Groenen Serrano, K., Reynes, O., Tzedakis, T., *Journée Toulousaine d'Electrochimie* 2008

“A comparison between enzymatic and indirect electroenzymatic regeneration of the pyridinic cofactor NADH in a micro-structured reactor”, Roche, J., Groenen Serrano, K., Reynes, O., Tzedakis, T., *61st Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry*, Nice 2010.

Publication :

“Electrochemical study in both classical cell and microreactors of flavin adenine dinucleotide as a redox mediator for NADH regeneration”, Tzedakis, T., Cheikhou, K., Roche, J., Groenen Serrano, K., Reynes, O., *Electrochemical Acta*, vol. 55 (2010) 2286-2294.

Brevet :

« Nouveau procédé de régénération enzymatique continue de NADH et de détection de NAD⁺ et système pour sa mise en œuvre », Roche, J., Tzedakis, T., Groenen Serrano, K., Reynes, O., n° de demande 1055209, n° de soumission 1000083253, en cours.

SOMMAIRE

| | |
|--------------------------|-----------|
| Introduction..... | 11 |
|--------------------------|-----------|

CHAPITRE I : Revue Bibliographique

| | |
|--|----|
| I. Contexte de l'étude..... | 18 |
| 1) Les cofacteurs enzymatiques : généralités..... | 20 |
| 2) Le cofacteur pyridinique NAD^+/NADH | 21 |
| 3) Exemples d'applications du cofacteur NADH..... | 23 |
| 3.1) Application en synthèse..... | 23 |
| 3.2) Applications en biodétection..... | 24 |
| 3.3) Applications : les biopiles à combustibles..... | 27 |
| II. Régénération de la forme réduite du cofacteur NADH..... | 29 |
| 1) Régénération biologique et enzymatique..... | 30 |
| 1.1) Régénération biologique..... | 31 |
| 1.2) Régénération enzymatique..... | 31 |
| 2) Régénération électrochimique et électroenzymatique..... | 34 |
| 2.1) Régénération électrochimique..... | 35 |
| 2.2) Régénération électroenzymatique..... | 38 |
| 3) Régénération chimique et photochimique..... | 40 |
| 4) Récapitulatif..... | 43 |
| 5) Conclusion..... | 44 |

| | |
|---|-----------|
| III. Techniques d'immobilisation enzymatique..... | 46 |
| 1) Immobilisation par adsorption..... | 49 |
| 2) Immobilisation par liaisons covalentes..... | 52 |
| 3) Immobilisation par encapsulation..... | 55 |
| 3.1) Immobilisation sol-gel..... | 55 |
| 3.2) Immobilisation au sein d'un polymère électro-généré..... | 57 |
| 3.3) Immobilisation au sein d'un polymère..... | 58 |
| Références..... | 62 |
| CHAPITRE II: L'enzyme <i>formate déshydrogénase</i> issue de <i>Candida Boidinii</i> : cinétique et immobilisation | |
| I. Introduction..... | 74 |
| II. Etude liminaire : protocole d'analyse..... | 76 |
| 1) Quantification du cofacteur réduit NADH | 76 |
| 2) Quantification de l'enzyme <i>formate déshydrogénase</i> | 77 |
| III. Mécanismes et cinétique enzymatique..... | 79 |
| 1) Rappel de cinétique enzymatique..... | 79 |
| a) Cinétique à un substrat sans inhibition..... | 80 |
| b) Cinétique à deux substrats..... | 81 |
| i) Mécanisme bi-bi ordonné..... | 82 |
| ii) Mécanisme de Theorell-Chancelle..... | 83 |
| iii) Mécanisme ping pong..... | 84 |

| | |
|---|-----|
| iv) Mécanisme aléatoire..... | 85 |
| 2) Détermination du mécanisme et des paramètres cinétiques associés à la <i>formate déshydrogénase</i> issue de <i>Candida Boidinii</i> | 85 |
| IV. Immobilisation de l'enzyme <i>formate déshydrogénase</i> | 90 |
| 1) Immobilisation par adsorption..... | 91 |
| a) Nettoyage et état de surface..... | 91 |
| b) Adsorption de l'enzyme | 93 |
| c) Résultats et interprétations..... | 94 |
| 2) Immobilisation dans une matrice de Nafion® modifié..... | 96 |
| a) Préparation du Nafion® modifié..... | 98 |
| b) Immobilisation enzymatique dans le Nafion® modifié... | 99 |
| c) Caractérisation..... | 99 |
| d) Résultats et interprétations..... | 100 |
| i) Inclusion homogène..... | 101 |
| ii) Inclusion couche par couche..... | 101 |
| 3) Immobilisation dans une matrice de chitosan modifié..... | 103 |
| a) Synthèse de l'alkylchitosan..... | 104 |
| i) Désacétylation du chitosan..... | 104 |
| ii) Addition des chaînes alkyl..... | 105 |
| b) Inclusion de l'enzyme..... | 105 |
| i) Choix du solvant de suspension..... | 106 |
| ii) Inclusion <i>via</i> une émulsion..... | 107 |
| iii) Inclusion couche par couche..... | 108 |

| | |
|--|------------|
| V. Conclusion..... | 111 |
| Références..... | 112 |
| CHAPITRE III: Procédé de régénération enzymatique de NADH en réacteur filtre-presse – Optimisation et caractérisation | |
| I. Introduction..... | 115 |
| II. Le microréacteur multicanaux de type filtre presse..... | 116 |
| III. Optimisation de la quantité d'enzymes immobilisée..... | 120 |
| 1) Protocole expérimental..... | 120 |
| 2) Résultats et interprétations..... | 121 |
| IV. Durée de vie de l'enzyme immobilisée..... | 126 |
| V. Influence des débits et recyclage continu..... | 128 |
| 1) Influence des débits de circulation..... | 128 |
| 2) Recyclage continu..... | 132 |
| VI. Application à la synthèse du L-lactate..... | 136 |
| 1) Protocole d'analyses..... | 137 |
| 2) Résultats et interprétations..... | 138 |
| VII. Conclusion..... | 141 |

| | |
|------------------------|------------|
| Références..... | 143 |
|------------------------|------------|

CHAPITRE IV : Modélisation

| | |
|--|---------|
| I. Introduction | 146 |
| II. Modélisation physico-chimique de la génération de NADH | 147 |
| 1) Equations de continuité | 150 |
| 2) Conditions aux limites | 153 |
| 3) Présentation du logiciel | 154 |
| III. Résultats et interprétations | 156 |
| 1) Epaisseur de couche | 156 |
| 2) Paramètres..... | 157 |
| 3) Simulations | 158 |
| IV. Conclusion | 163 |
| Références | 164 |
| Conclusion | 165 |

Introduction

Ces dernières décennies ont vu de nombreuses avancées dans le domaine des biotechnologies. Reproduire, du moins mimer, les processus biologiques n'est plus tout à fait du domaine de l'impossible, et à ce titre, les protéines, et plus particulièrement les enzymes, en tant que catalyseurs, constituent un sujet d'étude privilégié pour le développement de nouveaux procédés de synthèse sélectifs. Les nombreux progrès en termes d'isolation, de purification et de stabilisation de ces protéines, mais également le développement de l'ingénierie génétique, ont conduit à une intensification de la recherche dans ce domaine, qui n'intéresse plus seulement la biologie mais aussi le génie des procédés.

En effet, les enzymes sont susceptibles de catalyser une grande variété de réactions conduisant à des fonctions aussi diverses que les alcools, les hydroxyacides, les acides aminés, les aldéhydes ou les cétones. Là où les synthèses chimiques classiques nécessitent souvent plusieurs étapes de catalyses, d'extractions et de purifications, les synthèses enzymatiques permettent l'obtention de composés complexes, en une seule étape, le plus souvent en milieu aqueux. De plus, elles fonctionnent à température et pression ambiante, ce qui diminue le coût énergétique d'un procédé de synthèse. A l'heure actuelle, ce type de catalyse est appliquée à la préparation de synthons pharmaceutiques, de compléments et d'additifs alimentaires, de produits cosmétiques ou encore d'herbicides ou d'insecticides.

Historiquement, les premières biotransformations sont utilisées empiriquement depuis des millénaires, il s'agit des procédés de fermentation, qui mettent en œuvre des réactions enzymatiques en cascade. Ces procédés ont fait l'objet d'améliorations considérables ces dernières décennies, notamment grâce au progrès du génie génétique. Ainsi, il est possible de sélectionner une souche de micro-organisme particulièrement adaptée à la biotransformation envisagée, voire de surexprimer le gène codant pour

une enzyme particulière. Néanmoins, les micro-organismes contiennent de nombreux catalyseurs biologiques différents qui conduisent à autant de réactions secondaires. Le produit d'intérêt doit donc être extrait d'un milieu complexe contenant la biomasse, les substrats et les produits secondaires. Au contraire, extraire l'enzyme du micro-organisme qui l'a produit, avant de la mettre en œuvre dans un procédé de synthèse, permet d'exploiter à plein la sélectivité unique de ces protéines.

Parmi les enzymes les plus prometteuses, se trouvent celles de la famille des *oxydoréductases* qui catalyse les transferts de protons et d'électrons. Au sein de cette famille, les enzymes appelées *déshydrogénases* ont fait l'objet d'une attention toute particulière. En effet, ces catalyseurs peuvent transformer un substrat en une molécule chirale, présentant une grande pureté optique, souvent supérieure à 99%. Cette propriété ouvre de nombreuses possibilités de synthèse, notamment en pharmacie, où nombre de principes actifs sont des molécules chirales dont les propriétés dépendent de leur conformation. Il devient ainsi possible de préparer des molécules optiquement très pures, sans passer par l'étape de dédoublement d'un mélange racémique, souvent complexe, coûteuse voir impossible.

Afin d'assurer le transfert d'électron, les *déshydrogénases* emploient un accepteur/donneur d'électrons spécifique, le cofacteur nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^+/NADH). Cette molécule est capable de transférer un proton et deux électrons aux substrats enzymatiques. Le coût élevé de cette molécule (environ 50 k€ par mole) interdit son ajout en quantité stœchiométrique lors de synthèse enzymatique. Une solution possible à ce problème consiste à régénérer la forme du cofacteur impliquée dans la synthèse.

De nombreuses méthodes de régénération des deux formes du cofacteur ont été développées depuis les années 60 : chimique ou photochimique, électrochimique ou électroenzymatique ou purement enzymatique. Ces dernières années cependant, les méthodes enzymatiques semblent prendre le pas sur les autres méthodes.

En ce qui concerne la régénération de la forme réduite du cofacteur, la méthode employant l'enzyme *formate déshydrogénase* et le substrat formate se distingue par son efficacité. Cependant, la *formate déshydrogénase* est une enzyme coûteuse et sensible aux conditions opératoires. Afin de réduire les quantités d'enzymes mises en jeu lors des synthèses, une voie prometteuse consiste à l'immobiliser sur un support inerte. De plus, l'immobilisation enzymatique est susceptible de stabiliser la protéine en figeant la conformation spatiale de l'enzyme, responsable de ces propriétés catalytiques.

Le travail présenté dans ce mémoire s'intéresse à la régénération de la forme réduite du cofacteur, NADH, à partir de la forme oxydé, NAD^+ *via* la formate déshydrogénase, avec un triple objectif :

- ✓ Développer une méthode viable d'immobilisation de la *formate déshydrogénase*, connue pour sa sensibilité physico chimique importante, permettant de maintenir son activité enzymatique avec une durée de vie la plus élevée possible.
- ✓ Mettre en œuvre cette méthode de régénération *in situ* lors d'une synthèse enzymatique en continue, dans un réacteur filtre presse micro-structuré développé au laboratoire en 2002.
- ✓ Comprendre et mettre en évidence le facteur limitant l'avancement de la régénération du cofacteur NADH.

Le mémoire s'articule autour de quatre chapitres.

Après une présentation du contexte et des applications liées au cofacteur NADH, le chapitre bibliographique recense les principales méthodes de régénération de NADH en listant leurs avantages et leurs inconvénients. La troisième partie quant à elle, offre une vue d'ensemble, non exhaustive, des différentes méthodes d'immobilisation enzymatique développées à ce jour. Cette partie permet de dégager les orientations choisies dans cette étude.

Le chapitre II présente différents essais de protocoles d'immobilisation de la *formate déshydrogénase*, sur un support métallique. Outre les critères définis précédemment (activité enzymatique, durée de vie), la rétention du catalyseur immobilisé, lors de la conduite d'un procédé en continu, est l'objet d'une attention toute particulière.

Le troisième chapitre s'intéresse à la mise en œuvre de l'enzyme immobilisée pour régénérer NADH dans un réacteur filtre presse micro-structuré. La quantité d'enzyme *formate déshydrogénase* immobilisée est d'abord optimisée puis l'influence du débit et du mode de fonctionnement du réacteur (recyclage continu, discontinu) est étudiée. Enfin, une application du procédé de régénération de NADH est réalisée *in situ* lors de la synthèse enzymatique du L-lactate à partir du pyruvate.

Le dernier chapitre présente la modélisation physico chimique de la régénération de NADH dans le réacteur fonctionnalisé. Un bilan de matière effectué sur le cofacteur NAD^+ , en régime stationnaire, tenant compte des différents mécanismes de transferts de matière permet d'établir les équations de continuité du système. Le profil de concentration en cofacteur au sein du réacteur est ainsi établi. Le modèle permet d'appréhender les différentes limitations du procédé pour, dans un second temps, proposer des perspectives d'amélioration.

Chapitre I : Revue bibliographique

SOMMAIRE

| | |
|--|----|
| I. Contexte de l'étude..... | 18 |
| 1) Les cofacteurs enzymatiques : généralités..... | 20 |
| 2) Le cofacteur pyridinique NAD^+/NADH | 21 |
| 3) Exemples d'applications du cofacteur NADH..... | 23 |
| 3.1) Application en synthèse..... | 23 |
| 3.2) Applications en biodétection..... | 24 |
| 3.3) Applications : les biopiles à combustibles..... | 27 |
| II. Régénération de la forme réduite du cofacteur NADH | 29 |
| 1) Régénération biologique et enzymatique..... | 30 |
| 1.1) Régénération biologique..... | 31 |
| 1.2) Régénération enzymatique..... | 31 |
| 2) Régénération électrochimique et électroenzymatique..... | 34 |
| 2.1) Régénération électrochimique..... | 35 |
| 2.2) Régénération électroenzymatique..... | 38 |
| 3) Régénération chimique et photochimique..... | 40 |
| 4) Récapitulatif..... | 43 |
| 5) Conclusion..... | 44 |

| | |
|---|-----------|
| III. Techniques d'immobilisation enzymatique..... | 46 |
| 1) Immobilisation par adsorption..... | 49 |
| 2) Immobilisation par liaisons covalentes..... | 52 |
| 3) Immobilisation par encapsulation..... | 55 |
| 3.1) Immobilisation sol-gel..... | 55 |
| 3.2) Immobilisation au sein d'un polymère électro-généré..... | 57 |
| 3.3) Immobilisation au sein d'un polymère..... | 58 |
| Références..... | 62 |

I. Contexte de l'étude

Les enzymes constituent des catalyseurs biologiques qui interviennent à toutes les échelles au sein des organismes vivants. Des mécanismes intracellulaires à la digestion, en particulier le cycle de Krebs, près de 3000 réactions biochimiques sont catalysées par des enzymes (Koeller, 2001 ; Thomas, 2002). De plus, on estime que moins de 1% des microorganismes existants ont vu leurs enzymes identifiées, ce qui laisse présager de nombreuses perspectives, en synthèse notamment (Hanefeld, 2009). Contrairement aux catalyseurs chimiques, les enzymes fonctionnent toujours à faible température et pression ambiante et présentent une grande spécificité vis-à-vis d'un nombre limité de substrats. Dans des milieux complexes, tel que le milieu cellulaire, elles ne vont accélérer spécifiquement que quelques réactions « cibles », et certaines enzymes ne commettent en moyenne qu'une erreur tous les 10^8 cycles catalytiques. Cette spécificité remarquable est utilisée pour le développement de biocapteurs permettant la détection, voir la quantification, de substrats cibles dans des milieux réels. En synthèse, cette propriété permet de limiter la formation de sous-produits comme des composés suroxydés, ou de conduire à des produits ayant une grande pureté optique (Thomas, 2002).

Une seconde propriété qui distingue les enzymes des catalyseurs chimiques est leur stéréospécificité (Koeller, 2001). En effet, de nombreuses molécules, dites chirales, existent sous deux formes. Leurs formules chimiques brutes restent identiques mais leurs conformations spatiales diffèrent. Un carbone asymétrique comportant quatre substituants distincts induit une chiralité. En chimie, on distingue les formes R et S (R pour « rectus », S pour « sinister ») selon le sens d'orientation des substituants autour du carbone asymétrique, classés selon les règles de Cahn, Ingold et Prelog. En biologie, on emploie la nomenclature D ou L (D pour « dextrogyre », L pour « lévogyre ») selon les

sens de déviation de la lumière polarisée. Il n'existe aucune corrélation entre les deux nomenclatures. Dans l'industrie pharmaceutique, de nombreux principes actifs sont des molécules chirales, dont seul un des deux isomères est biologiquement actif, alors que l'autre forme est au mieux inefficace, au pire toxique. Citons le cas de l'ibuprofène, dont seule la forme S est active. Dans le cas de la thalidomide, la forme L est un anti nauséeux (Dimopoulos, 2007) et la conformation D est responsable de malformations congénitales chez près de 10 000 nouveaux nés dans les années 60. Les synthèses chimiques classiques conduisent à des mélanges racémiques (R, S ou L, D) dont la séparation est ensuite délicate, coûteuse, voire impossible. Au contraire, de nombreuses réactions enzymatiques permettent d'obtenir des produits optiquement purs, c'est-à-dire dont seule une des deux conformations est présente. Certaines enzymes de la famille des déshydrogénases, par exemple, existent souvent sous deux formes, chacune conduisant à une conformation donnée. La synthèse enzymatique fait donc l'objet de recherches importantes.

Malgré les quantités « catalytiques » requises, relativement faible, leur utilisation à l'échelle industrielle est limitée du fait du coût associé à ces enzymes et à leurs cofacteurs, le cas échéant. Un moyen, pour qu'un procédé enzymatique soit économiquement viable consiste à minimiser la quantité d'enzyme requise dans les conditions opératoires favorables à son activité. Ainsi, l'effort de recherche s'est orienté vers leur stabilisation et leur immobilisation sur des supports inertes pour rendre leur exploitation économiquement réaliste.

1) Les cofacteurs enzymatiques : généralités

Les cofacteurs enzymatiques, de faible masse moléculaire devant les enzymes, sont essentiels à l'avancement de certaines réactions enzymatiques. Ils jouent le rôle de donneurs ou d'accepteurs d'atomes (H, S, O, hétéroatomes) ou d'électrons entre des réactions parallèles (Wichmann, 2005). Sur le plan fonctionnel, ils peuvent être classés suivant deux catégories :

- les cofacteurs libres en solution, tel que la nicotinamide adénine dinucléotide, qui peuvent être considérés comme des substrats à part entière (co-substrat)
- les cofacteurs liés à l'enzyme qui s'auto-régénèrent au sein des processus catalytiques dans lequel ils sont impliqués.

Pour environ 20% des enzymes, la présence d'un cofacteur libre est nécessaire à leur fonctionnement, c'est le cas des oxydoréductases, des ligases et des déshydrogénases. Au contraire, les hydrolases, les transférases et les lyases n'ont pas besoin de cofacteurs libres (Wichmann, 2005 ; Zhao, 2003).

Certains de ces cofacteurs interviennent dans des cascades de réactions complexes, tel que le cycle de Krebs, et n'ont de ce fait, peu ou pas fait l'objet d'application avec des enzymes isolées. C'est le cas par exemple de l'adénosine triphosphate ATP. D'autres, au contraire, ont fait l'objet de recherches intensives en termes d'isolation, de stabilisation et de régénération ce qui a conduit à un nombre croissant d'applications (Zhao, 2003):

-la nicotinamide adenine dinucléotide NADH, la nicotinamide adenine dinucléotide phosphate NADPH et la flavine adénine dinucléotide FAD pour le transferts d'électrons et de protons

-la nucléotide triphosphate NTP pour le transfert de phosphates

-la phospho-adénosine-phosphosulfate PAPS pour le transfert de sulfates

Or, leur coût élevé interdit leur utilisation en quantité stœchiométrique et nécessite d'envisager leur emploi en quantités catalytiques couplé à leur régénération *in situ*.

| Cofacteur | Prix en k€/mol | Masse molaire (g.mol ⁻¹) | Rôle de transfert |
|------------------|----------------|---|---------------------------------|
| NADH | 62 | 664 | H ⁺ ; e ⁻ |
| NAD ⁺ | 41 | 663 | H ⁺ ; e ⁻ |
| NADPH | 1100 | 743 | H ⁺ ; e ⁻ |
| FAD | 166 | 659 | H ⁺ ; e ⁻ |
| ATP | 10 | 507 | PO ₄ ³⁻ |

Tableau I.1 : Prix de quelques cofacteurs enzymatiques d'après le catalogue Sigma-Aldrich© Juin 2010

NADH: nicotinamide adenine dinucléotide ; NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ; FAD: flavin adenine dinucleotide; ATP: adenosine triphosphate

2) Le cofacteur pyridinique NAD⁺/NADH

Le cofacteur libre nicotinamide adenine dinucléotide, noté NADH, est associé à plus de 300 enzymes de la famille des déshydrogénases ; elles-mêmes étant un sous groupe des oxydoréductases. NAD⁺/NADH joue le rôle de couple redox associé à l'oxydation/réduction enzymatique d'un substrat spécifique. Le changement de degré

d'oxydation du substrat se fait via le transfert d'un proton du substrat vers le cofacteur (oxydation) ou du cofacteur vers le substrat (réduction).

NADH est composé de deux nucléotides liés par une liaison pyrophosphate. L'un des nucléotides est composé d'un ribose et d'une adénine et l'autre d'une nicotinamide et d'un ribose (figure I.2). Lors des réactions enzymatiques, un proton situé en position 4 du cycle aromatique de la nicotinamide est échangé avec le substrat. Ce cycle azoté s'insère dans le site actif de la déshydrogénase lors de la catalyse (Suhadolnik, 1977).

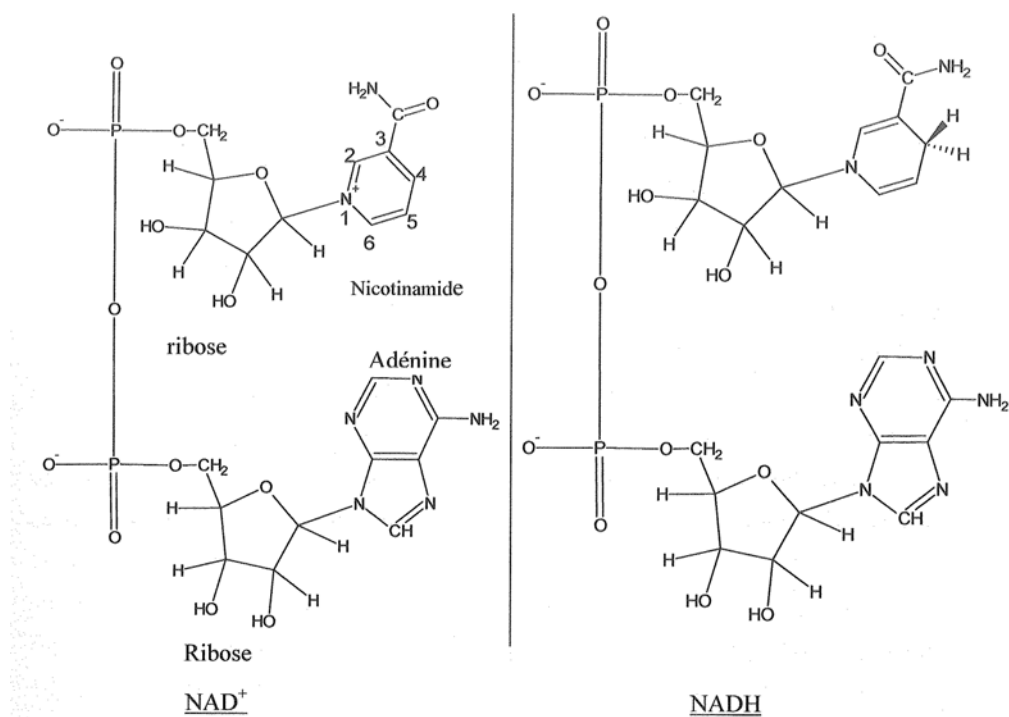


Figure I.2 : Formules développées des cofacteurs NAD⁺ (gauche) et NADH (droite)

Au sein du métabolisme cellulaire, le couple NAD⁺/NADH, associé à des déshydrogénases, intervient lors de nombreuses étapes du cycle de Krebs dont certaines conduisent à la formation d'ATP à partir d'ADP, fournissant ainsi de l'énergie aux cellules (Lehninger, 1969).

3) Exemples d'applications du cofacteur NADH

Le couple NAD^+/NADH , associé à une ou plusieurs déshydrogénases, trouve, à l'heure actuelle, des applications dans trois grands domaines qui sont la synthèse enzymatique, les biocapteurs et les biopiles à combustibles.

3.1) Application en synthèse

En 1993, 90% des molécules chirales disponibles sur le marché des médicaments étaient vendues sous la forme d'un mélange racémique (Samdani, 1993). La voie enzymatique, stéréosélective, est particulièrement intéressante pour répondre à la nécessité d'obtenir des molécules optiquement pures. Les *déshydrogénases*, de part leur grande versatilité, permettent le développement de blocs de synthèses chiraux comprenant des fonctions variées comme des alcools, des hydroxyacides, des acides aminés, des aldéhydes ou des cétones (Devaux-Basseguy, 1997).

Les acides aminés L-leucine et L-phénylalanine sont par exemple synthétisés à partir du mélange racémique de 2-hydroxyacides en employant une *alanine déshydrogénase* (Wandrey, 1986 ; Hummel, 1989). Ils constituent des apports alimentaires essentiels puisqu'ils ne peuvent pas être synthétisés par le corps humain. La production d'hydroxyacides, par réduction d'un acide α -cétonique ou par oxydation d'un alcool, présente également un grand intérêt puisqu'ils interviennent dans la préparation de nombreux principes actifs comme la pénicilline (Devaux-Basseguy, 1997). La synthèse de l'acide 3-(3,4-dihydroxyphenyl)lactique, dont la forme L intervient dans le traitement de la maladie de Parkinson, est catalysée par l'enzyme NAD-dépendante *hydroxy isocaproate déshydrogénase* (Rao, 1988). En règle générale, la transformation enzymatique d'alcools, de cétones et d'aldéhydes présente un grand intérêt pour les industries cosmétiques, alimentaires et pharmaceutiques en permettant de modifier des

molécules naturelles en molécule à haute valeur ajoutée. La synthèse du mannitol à partir du fructose en est un exemple (Kulbe, 1990). D'un point de vue plus académique, Wong *et al.* ont mis au point un procédé, en 1983, permettant la synthèse à l'échelle du laboratoire, de NADH deutéré afin de réaliser des marquages isotopiques sur les substrats pour l'étude de mécanismes biochimiques (Wong, 1983).

3.2) Application en bio-détection

Les propriétés électrochimiques du couple NAD^+/NADH et la présence de systèmes conjugués permettant l'absorption en UV-visible, font de ce cofacteur un outil puissant pour le développement d'outils analytiques. La grande sélectivité des enzymes peut être mise à profit afin de détecter des substrats spécifiques via leurs cofacteurs. En effet, le spectre d'absorption UV montre que seule la forme réduite NADH absorbe à 340 nm (figure I.3).

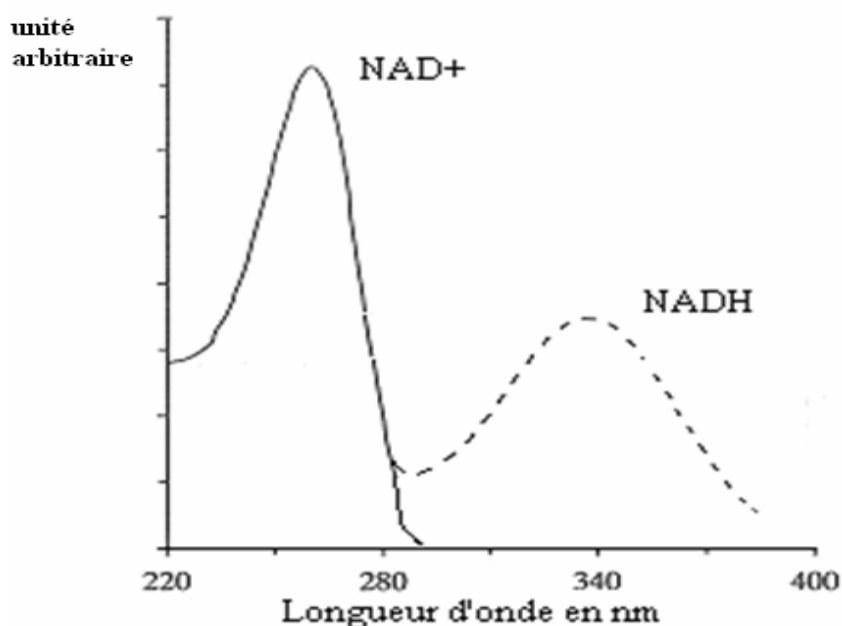


Figure I.3 : Allure des spectres UV-vis du cofacteur enzymatique : ____NAD⁺ ;---- NADH

Un protocole basé sur l'utilisation d'une *formate déshydrogénase* permet de déterminer la quantité d'ion formate HCO_2^- , présent en tant que conservateur dans un certain nombre de produits alimentaires tel que le vinaigre, le vin ou le miel (Mori, 2008). En présence d'ion formate, l'ajout d'enzyme et de cofacteur oxydé NAD^+ va conduire à une réaction totale (Eq. I.1) :



La mesure de l'absorbance à 340 nm permet alors de quantifier directement le NADH formé (le formate n'absorbe pas à 340 nm) et donc de déterminer la quantité initiale d'ion formate.

La nécessité de mener des analyses *in situ* et en temps réel a orienté la recherche vers le développement de capteurs électroenzymatiques. Dans cet esprit, l'étude du comportement électrochimique du couple NAD^+/NADH a reçu une attention considérable dès les années 50 (Rodkey, 1955 ; Gorton, *Wiley-VCH*, 2002). L'oxydation comme la réduction sont irréversibles et présentent de larges surtensions. De plus, des phénomènes de passivation ont été mis en évidence sur de nombreux matériaux d'électrodes (Moiroux, 1978 ; Radoi, 2009). L'usage de médiateurs électrochimiques s'est donc imposé comme une solution possible à ces problèmes (Gorton, *Rev. Molecul. Biotechnol.*, 2002). Avramescu *et al.* (2002) proposent ainsi un biocapteur de l'acétaldéhyde et de l'acide D-lactique basé sur la mesure du courant de réduction du médiateur, ici le bleu de Meldola (8-Diméthylamino-2,3-benzophénoxazine Hemi(zinc chloride)) (cf fig. I.4).

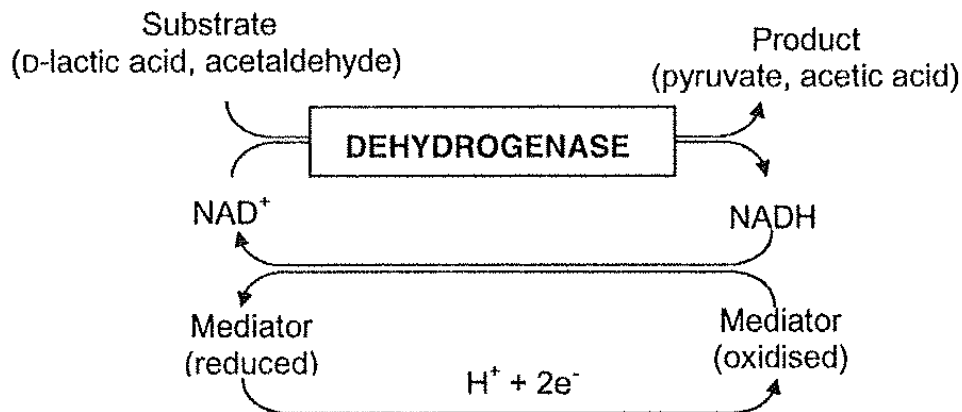


Figure I.4 : Principe du capteur électroenzymatique à acétaldéhyde et acide D-lactique développé par Avramescu et al (2002).

Ce capteur est constitué d'une fine couche de poly(vinyl alcool) dans laquelle est immobilisé une enzyme *D-lactate déshydrogénase* ou une *aldehyde déshydrogénase*. Grâce à leurs sélectivités, il est possible de quantifier par chronoampérométrie leur substrat, spécifiquement, dans un milieu complexe tel que le vin. Sur le même principe, l'acide malique peut être dosé en présence d'une *malate déshydrogénase* (Lupu, 2004). Cependant, de nombreuses contraintes restent à surmonter avant l'intégration industrielle de ce type de biocapteurs. Dans les milieux réels, il existe de nombreuses molécules susceptibles d'inhiber les enzymes NAD-dépendantes. De plus, l'immobilisation du catalyseur, du cofacteur et/ou du médiateur entraîne souvent une perte importante d'activité enzymatique. Enfin, le médiateur redox employé doit non seulement traduire la présence du substrat en courant électrique mais aussi régénérer intégralement le cofacteur ; or la réaction entre le médiateur et le cofacteur ne conduit pas systématiquement à une forme biologiquement active du couple $NAD^+/NADH$ (Katakis, 1997).

3.3) Application : les biopiles à combustible

Le cofacteur NADH trouve des applications importantes dans le domaine des biopiles à combustible. Le principe est connu depuis les années 60 (Yahiro, 1964): comme les piles à combustible classiques, il s'agit de transformer de l'énergie chimique en énergie électrique en oxydant un combustible à l'anode et en réduisant un oxydant à la cathode, généralement l'oxygène. Le catalyseur métallique de l'oxydation du carburant, généralement un métal noble, est ici remplacé par une enzyme, ce qui permet d'utiliser des combustibles organiques. Les déshydrogénases NAD-dépendantes catalysant les réactions de transfert électronique, les recherches se sont orientées vers cette famille de catalyseurs. Une biopile à combustible utilisant un mélange de deux déshydrogénases à l'anode pour oxyder l'éthanol (une *alcool déshydrogénase* et une *aldéhyde déshydrogénase*) et une *bilirubin oxydase* à la cathode pour réduire l'oxygène en est un bon exemple (Topcagic, 2006) (cf figure I.5).

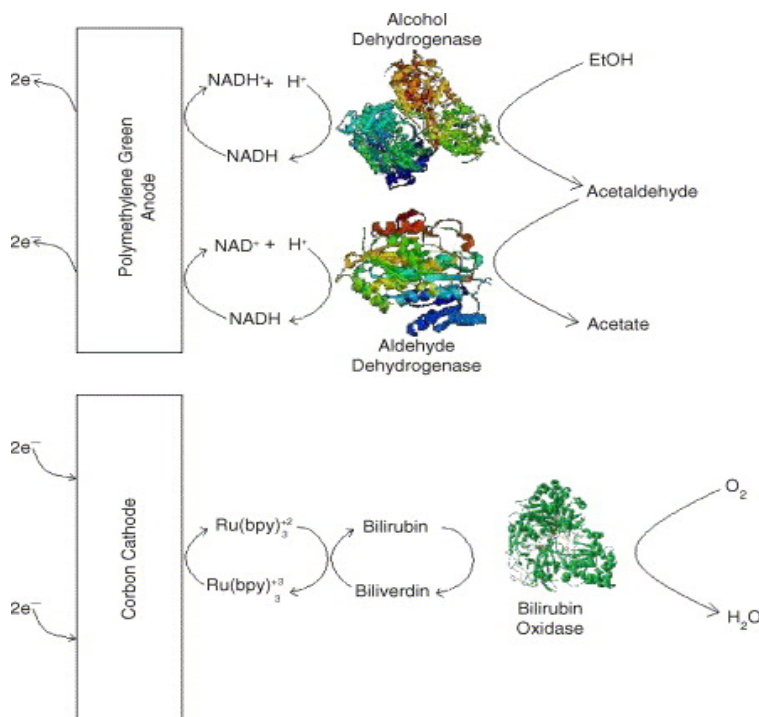


Figure I.5 : Principe de fonctionnement d'une biopile éthanol/oxygène développée par Topcagic et al (2005).

A l'anode, un mécanisme séquentiel permet de récupérer de l'énergie en oxydant en deux étapes le combustible, d'abord en acétaldéhyde puis en acétate. A la cathode, l'oxydant est l'oxygène de l'air qui est réduit en eau. Les enzymes étant confinées dans une matrice de Nafion au voisinage d'une électrode métallique, le cofacteur NAD^+/NADH joue le rôle de vecteur électronique entre le site actif de l'enzyme et l'électrode. Palmore et al. proposent également une solution élégante permettant d'oxyder le méthanol jusqu'au stade CO_2 en couplant trois déshydrogénases, une *alcool déshydrogénase*, une *aldéhyde déshydrogénase* et une *formate déshydrogénase* (Palmore, 1998). Le transfert électronique s'effectue du site actif de l'enzyme vers le cofacteur NAD^+/NADH , puis vers un médiateur redox déposé sur l'électrode.

La possibilité d'un transfert électronique direct entre certaines déshydrogénases et une interface chargée réactive a également été démontrée (Ghindilis, 1997). Une première bioanode composée de nanotubes de carbone employant une *glucose oxydase* sans médiateur redox a été décrit par Ivnitski *et al.* en 2006 (Ivnitski, 2006).

A l'heure actuelle, les performances des biopiles à combustible ne sauraient soutenir la comparaison avec les piles classiques en termes de puissance et de stabilité. Cependant, leurs grandes sélectivités couplées à leur fonctionnement dans les conditions physiologiques (pH, température, pression), peuvent destiner les biopiles à des applications médicales, fonctionnant *in vivo* de façon autonome, en puisant l'énergie chimique naturellement présente dans le sang, par exemple (Barton, 2004). Elles pourraient alimenter des dispositifs médicaux à faible puissance électrique tels que des capteurs autonomes sous-cutanés ou des stimulateurs électriques dans les cas de lésions nerveuses (Craelius, 2002).

II. Régénération de la forme réduite du cofacteur NADH

Lors de synthèses enzymatiques faisant intervenir un cofacteur, la viabilité économique du procédé dépend en grande partie de l'efficacité de la régénération de ce cofacteur. Initialement, le NAD(H) peut être obtenu par fermentation bactérienne (Nakayama, 1968) ou par isolation à partir de levures (Watanabe, 1975). Dans les deux cas, le protocole de purification, particulièrement lourd à mettre en œuvre explique le coût important de cette molécule. La régénération s'effectue soit par oxydation de NADH en NAD^+ , soit par réduction de NAD^+ en NADH, selon le procédé considéré. La bibliographie abondante sur le sujet implique que seule la régénération de la forme réduite, NADH, sera abordée dans ce travail.

La forme réduite du cofacteur NADH est plus stable en milieu basique contrairement à la forme oxydé NAD^+ qui est plus stable en milieu acide. Wong et al. (Wong, 1981) ont montré que leurs dégradations obéissaient à une cinétique d'ordre 1 dont la constante cinétique apparente dépend du pH et de la nature du tampon pH utilisé. Globalement, NADH est moins stable que la forme oxydée sauf à un pH supérieur à 9, ce qui explique son coût plus important (cf tableau I.1). Par exemple, dans un tampon de triethanolamine à pH 7, la constante cinétique de dégradation de NADH, de $6,3 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$, est environ dix fois supérieure à celle de NAD^+ .

Les méthodes de régénération sont classées en trois grandes familles :

- enzymatique et biologique
- électrochimique et électroenzymatique
- chimique et photochimique

Pour quantifier et comparer l'efficacité d'une méthode de régénération, Chenault *et al.* (Chenault, 1987) ont définis deux nombres :

-le nombre de cycles (turnover number, TN, en h^{-1} , Eq. I.2)

-le nombre total de cycles (total turnover number, TTN, sans dimension, Eq. I.3).

$$TN = \frac{\text{moles de produit}}{\text{moles initiales de cofacteur} \times \text{temps de réaction}}$$

I.2

$$TTN = \frac{\text{moles de produit}}{\text{moles initiales de cofacteur}}$$

I.3

Le TN, homogène à une fréquence, va traduire la vitesse à laquelle le cofacteur est régénéré. Le TTN, quant à lui, va représenter le nombre de cycle réaction/régénération que va subir le cofacteur pendant toute la durée de la synthèse.

1) Régénération biologique et enzymatique

La régénération biologique se distingue de la régénération enzymatique en ce qu'elle n'emploie pas d'enzymes comme catalyseur, mais des microorganismes complets; généralement des bactéries ou des levures.

1.1) Régénération biologique

Grâce à l'apport des technologies de recombinaison génétique, l'usage de microorganismes complets pour la synthèse couplée à la régénération des cofacteurs s'est développé de manière importante (Endo, 2001).

Le principe consiste à sélectionner une souche de microorganisme contenant l'enzyme adaptée à la synthèse souhaitée et de surexprimer les gènes codant de cette protéine et/ou codant des enzymes impliquées dans la régénération du cofacteur (Kataoka, 1999). A titre d'exemple, il est ainsi possible de régénérer NADH à l'aide de substrats peu coûteux tel que le glucose. Matsuyama *et al.* ont ainsi préparé, sans ajout de cofacteurs, à l'échelle semi industrielle le (R)-1,3-butanediol en employant une *Escherichia coli* exprimant un gène de la levure *Candida Parapsilosis* codant pour une (R)-1,3-butanediol déshydrogénase (Matsuyama, 2001). Cette molécule est un synthon chiral important pour la préparation d'antibiotiques de la famille des carbapenem. Cependant, l'emploi de cellules vivantes présente des inconvénients. La sélectivité des réactions est généralement moins importante qu'avec des enzymes isolées, ce qui conduit bien souvent à des suroxydations des produits de réaction ou à de faibles puretés optiques (Duetz, 2001). De plus, l'activité enzymatique par unité de masse est plus faible que lors d'une synthèse purement enzymatique et la croissance cellulaire est souvent inhibée par les produits de synthèse, limitant ainsi la durée de vie du procédé.

1.2) Régénération enzymatique.

Deux approches peuvent être envisagées lors d'une régénération enzymatique du cofacteur NADH (figure I.6). La première, dite à substrat couplé, va employer l'enzyme de production pour régénérer le cofacteur. En plus du substrat à transformer, l'ajout d'un second substrat sacrificiel va permettre de réaliser les deux réactions, synthèse et régénération (fig. I.6a). La seconde, dite à enzyme couplée, va utiliser une autre enzyme et un second substrat, tous les deux dédiés à la régénération de NADH (fig. I.6b) (Van der Donk, 2003)

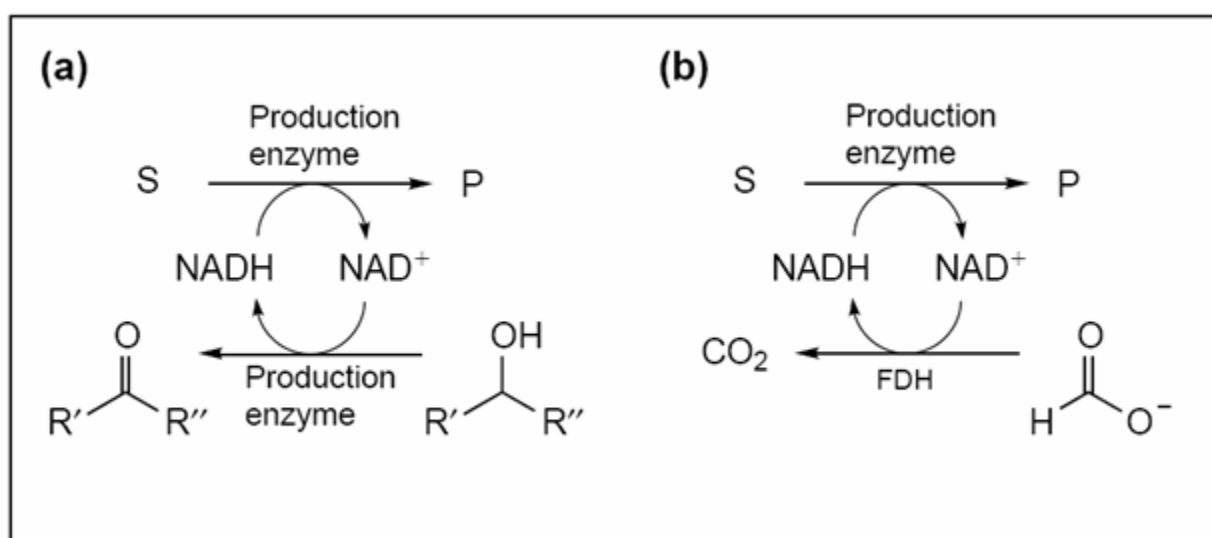


Figure I.6 : Schéma du mécanisme de régénération de NADH (a) à substrat couplé, (b) à enzyme couplée.
 (Van der Donk, 2003)

L'application de la régénération à substrat couplé reste très marginale car très peu d'enzymes présentent une double spécificité, substrat de production et substrat sacrificiel. En revanche, la régénération à enzyme couplée fait l'objet d'importants efforts de recherche.

La méthode de régénération la plus largement étudiée, et la seule à être employée industriellement, utilise la *formate déshydrogénase* en présence d'ions formate HCO₂⁻ selon la réaction I.1 définie précédemment:



Le formate est un substrat peu coûteux (moins de 1/1000 du prix de NADH) et non toxique. Aucune étude ne fait état d'effet inhibiteur sur les déshydrogénases (Bommarius, 1998). De plus, la réaction I.1 conduit à la formation de CO₂ évacué par dégazage au fur et à mesure de sa production, ce qui, d'une part, favorise la régénération de NADH en déplaçant l'équilibre de la réaction, et d'autre part, simplifie la purification du produit. En effet, le formate restant peut être facilement précipité sous forme d'hydrogénocarbonates. Ainsi, ce système offre quelques uns des meilleurs TTN de la littérature. La synthèse du L-tert leucine, par exemple, couplée à la régénération de NADH *via* une *formate déshydrogénase* atteint un TTN de 125000 (Kragl, 1993).

Cependant, la *formate déshydrogénase* (FDH) est coûteuse (1,20 €/U, prix Sigma Aldrich®, Juin 2010), son activité est faible (6 U.mg⁻¹) et elle est très sensible aux solvants organiques qui constituent souvent les substrats à transformer ou les produits (l'unité U est définie comme la quantité d'enzyme capable de transformer une μmole de substrat par minute à 25°C). Groger *et al.* (Groger, 2003) emploient une *formate déshydrogénase* pour la régénération du cofacteur NADH lors de la synthèse d'alcools chiraux. En milieu bi-phasique contenant 20% de n-heptane, l'enzyme conserve 90% de son activité pendant 65h. Cette stabilité constitue l'une des meilleures performances relevées avec une FDH libre en solution. Théoriquement, le confinement de cette enzyme est susceptible d'améliorer cette durée de vie et motive en partie ce travail.

L'ingénierie génétique apporte aussi des solutions. Deux nouvelles *formates déshydrogénases* mutantes, notés FDHC23S et FDHC23S/C262A, ont été développées. Elles présentent une amélioration de leur stabilité vis-à-vis des solvants organiques mais au détriment de leur stabilité thermique (Slusarczyk, 2000).

Récemment, une nouvelle enzyme, la *phosphite déshydrogénase* a été isolée et permet la régénération de NADH. Il s'agit de la première déshydrogénase capable d'oxyder les phosphites inorganiques en phosphate (Garcia Costas, 2001).

Cependant, bien que sa compatibilité avec plusieurs déshydrogénases ait été étudiée, son intérêt industriel reste à démontrer par des études de durée de vie et de stabilité.

2) Régénération électrochimique et électroenzymatique

Devant les coûts induits par les systèmes de régénération enzymatique, de nombreuses équipes se sont intéressées à la faisabilité d'un procédé de réduction électrochimique ou électroenzymatique du cofacteur NAD^+ .

L'objectif de ce type de régénération est de supprimer l'utilisation d'un substrat sacrificiel par voie électrochimique :

- directe, par transfert électronique à l'électrode (fig. I.7 A).
- indirecte, par réaction redox avec un médiateur régénéré à l'électrode (fig. I.7 B)
- électroenzymatique, par réaction enzymatique entre un médiateur régénéré à l'électrode et le cofacteur (fig. I.7 C)

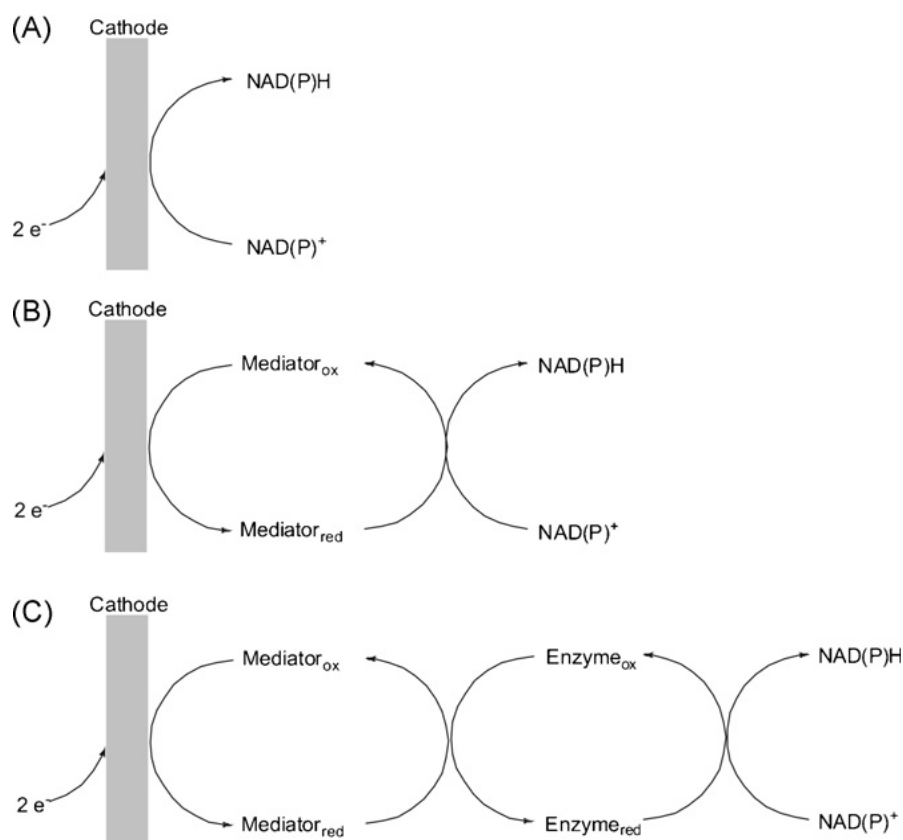
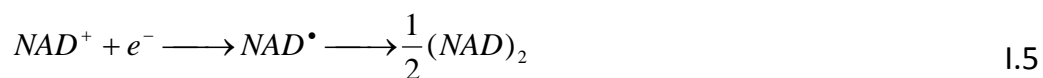


Figure 1.7 : Réduction du cofacteur NAD^+ , (A) réduction électrochimique directe, (B) réduction électrochimique indirect via un médiateur rédox, (C) réduction électroenzymatique indirect via un médiateur rédox. (Kohlmann, 2008)

2.1) Régénération électrochimique

La formation de NADH par réduction directe de NAD^+ (Eq. I.4) n'est pas aisée. En effet, le potentiel standard du couple rédox NAD^+/NADH est de $-0,237 \text{ V}_{\text{ENH}}$. Cependant, la surtension de réduction de NAD^+ est importante, entre 650 et 1350 mV selon les matériaux ; l'activation de l'électrode apparaît donc à des potentiels très cathodiques (Schmakel, 1975). De plus, la réduction directe de NAD^+ en NADH subit une réaction compétitive : la formation de radicaux NAD^\bullet qui peuvent ensuite dimériser (Eq. I.5).



Ces deux réactions parallèles interviennent aux mêmes potentiels et il est difficile de distinguer deux vagues de réduction. Seule la polarographie permet d'observer séparément la réduction en NADH et la formation de radicaux (Janik, 1968). Le mécanisme mis en jeu indique une première étape de formation de NAD^\bullet à $-1,2V_{ECS}$ suivi d'une deuxième vague de réduction à $-1,8V_{ECS}$ correspondant à la formation de NADH. La régénération électrochimique directe conduit donc à des traces de NADH enzymatiquement actif, dans un mélange de sous produits.

Cependant, quelques travaux montrent qu'il est possible de réaliser cette réduction directe dans des conditions spécifiques. Le principe consiste à n'employer que de faibles quantités de NAD^+ ($<0,5\text{mmol.L}^{-1}$) en solution de manière à inhiber la dimérisation. En effet, la faible concentration de radicaux va fortement ralentir l'étape de dimérisation et NAD^\bullet peut s'oxyder de nouveau en NAD^+ . Ainsi, Baik *et al.* (Baik, 1999) ont réalisé la réduction directe avec une cathode constituée d'un amalgame Au/Hg sur laquelle est adsorbé du cholestérol couplé à une faible quantité de NAD^+ (0,1 mM). Celui-ci va inhiber en grande partie la dimérisation. Une vague de réduction est observée à $-1,2 V_{ECS}$, soit un potentiel moins cathodique que sur une électrode en or. Couplée à la synthèse du D-lactate, cette méthode de régénération de NADH conduit à un TTN de 1400.

De même, Siu *et al.* (Siu, 2007) ont employé une électrode de Pt recouverte d'un gel de silice et de vanadium pour régénérer NADH couplé à la synthèse du L-glutamate, améliorant encore les performances avec un TTN de 3300. Cependant, l'emploi de faibles quantités de cofacteur implique une productivité limitée.

Une voie possible pour améliorer la conversion de NAD^+ est l'emploi de médiateurs rédox. Le choix du couple électrochimique doit répondre à un certain nombre de critères résumés par Steckhan et al. (Steckhan, 1994) :

- ✓ Le médiateur doit être capable de transférer deux électrons en une seule étape,
- ✓ L'activation du médiateur doit se faire à un potentiel moins négatif que $-0,9 \text{ V}_{\text{ECS}}$ pour éviter la réduction directe de NAD^+ ,
- ✓ Le médiateur ne doit pas réduire le ou les substrats enzymatiques,
- ✓ La réaction entre le médiateur réduit et NAD^+ ne doit conduire qu'à du NADH enzymatiquement actif.

A ces critères spécifiques s'ajoutent les conditions thermodynamiques : le potentiel standard du couple électrochimique doit être inférieur au potentiel standard de NAD^+/NADH .

Les complexes de rhodium, plus particulièrement ceux contenant le ligand Cp^* (pentaméthylcyclopentadienyl), répondent à l'ensemble de ces critères. La synthèse du D-lactate est réalisée en régénérant *in situ* NADH à l'aide du complexe $[\text{Cp}(\text{Me})_5\text{Rh}(\text{bpy})\text{Cl}]\text{Cl}$ par électrolyse à $-0,6\text{V}_{\text{ECS}}$ (Ruppert, 1987). Un autre complexe de rhodium, lié à différents polymères hydrosolubles, est également employé dans un réacteur électrochimique à membrane (Steckhan, 1994). Le $\text{Cp}^*\text{Rh}(4\text{-ethoxy-méthyl-2,2-bpy})\text{L}$ (L représente différents polymères) peut ainsi être retenu dans le réacteur par exclusion stérique. Ce système est alors appliqué à la synthèse du (S)-4-phenyl-2-butanol à l'aide d'une *alcool déshydrogénase*. Ces méthodes, bien que très sélectives vis-à-vis de la formation de NADH enzymatiquement actif, souffrent de vitesses de réaction faibles (TN de l'ordre de 5 h^{-1}) et d'un faible nombre de cycles total (TTN de l'ordre de 100).

Outre l'immobilisation enzymatique, l'enzyme de production peut également être maintenue au voisinage de l'électrode de travail à l'aide d'une membrane d'ultrafiltration et couplée à un système de régénération électrochimique. Délécouls-Servat *et al.* confinent ainsi un complexe de rhodium sur une électrode en feutre de carbone pour régénérer NADH (Délécouls-Servat, 2002).

2.2) Régénération électroenzymatique

Dans le cas de la régénération électroenzymatique du cofacteur, très peu d'études font état d'un transfert électronique direct. Cantet *et al.* (Cantet, 1996) ont cependant pu mettre en évidence un transfert électronique direct entre une électrode de platine et une hydrogénase issue de *Alcaligenes eutrophus*, catalysant la réduction de NAD^+ selon la réaction I.6.



Couplée à la synthèse du L-glutamate *via* une *glutamate déshydrogénase*, cette méthode réduit le coût de la réaction et simplifie la séparation du produit final grâce à l'absence de médiateurs. Un TN de 200 h^{-1} , traduit une vitesse de réaction très élevée. Cependant, bien que la polarisation ait tendance à stabiliser l'enzyme, sa durée de vie, d'environ 5h, reste trop courte pour rendre économiquement viable ce procédé. Ceci se traduit par un TTN de 10^3 , faible malgré une vitesse initiale élevée. Une seconde étude (Gros, 1996), emploie une hydrogénase différente issue de *Rhodococcus opacus*, présentant de meilleures propriétés catalytiques, ce qui conduit à une vitesse de réduction de NAD^+ sept fois plus importante. Le transfert électronique direct entre une électrode et une enzyme capable de réduire le cofacteur NAD^+ est une voie prometteuse mais l'absence d'enzyme capable de fonctionner plus de quelques heures reste rédhibitoire.

L'essentiel des travaux se concentre cependant sur la régénération électroenzymatique indirecte via un médiateur rédox. Les plus étudiés sont les dérivés du méthyl viologène.

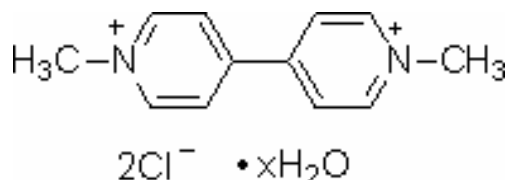


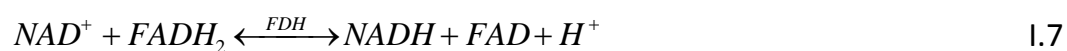
Figure I.8 : Formule développée du méthyl viologène ou chlorure de paraquat

Divers auteurs couplent ce médiateur à une enzyme, la *diaphorase*. Kim *et al.* (1999) emploient une électrode constituée d'un amalgame Au/Hg pour réduire le méthyl viologène MV^{2+} en MV^+ . De même, lors de la synthèse du D-lactate à partir du pyruvate catalysée par une *lactate déshydrogénase*, le méthyl viologène peut être réduit sur une cathode de tungstène (Dicosimo, 1981). Ces méthodes conduisent à des TTN d'environ 900. L'enzyme *diaphorase* peut être avantageusement remplacée par une *lipoamide déshydrogénase* LipDH. L'enzyme et le méthyl viologène sont immobilisés dans une électrode poreuse en graphite, recouverte d'une membrane cationique, et employée comme système de régénération de NADH couplé, ici aussi, à la synthèse du D-lactate (Fisher, 2000). Notons que le méthyl viologène doit être employé en milieu anoxique et est un composé toxique et polluant. De plus, l'ensemble de ces procédés sont limités par la vitesse de réaction chimique entre le médiateur réduit et le cofacteur, ce qui constitue un inconvénient notable du méthyl viologène.

Le cofacteur flavine adénine dinucléotide FAD, peut également être employé en tant que médiateur pour la régénération de NADH. Lors de la synthèse du (R)-mandalate catalysée par l'enzyme NAD-dépendante *benzoylformate reductase*, FAD est ainsi employé comme médiateur électrochimique entre une électrode Au/Hg et le NAD^+ ; cette étape peut être catalysée soit par une *lipoamide déshydrogénase* soit par

une *diaphorase* (Kim, 2004). Bien que plus coûteux, FAD n'est pas toxique et n'a jamais montré d'effet inhibiteur sur les enzymes, contrairement au MV^{2+} . Cependant, le nombre de cycles de réaction est plus faible qu'avec le méthyl viologène puisque les TTN obtenus sont de l'ordre de 150.

En 1991, Bergel *et al.* (1991) ont montré qu'une *formate déshydrogénase* FDH pouvait également catalyser cette réaction entre la forme réduite de FAD, notée $FADH_2$, et NAD^+ selon l'équation I.7.



Cette réaction, thermodynamiquement peu favorable, implique que le rapport $[FADH_2]/[FAD]$ soit important pour déplacer l'équilibre vers la régénération de NADH. Or, la forme réduite étant instable en solution, l'emploi d'une couche mince est nécessaire pour mener à bien cette réaction. En revanche, le TTN de 450 obtenu montre une amélioration significative grâce à l'emploi de la *formate déshydrogénase*. En 2005, ces travaux ont donné lieu à la thèse de Cheikhou Kane au Laboratoire de Génie Chimique et consistaient à mettre en œuvre cette réaction, non plus dans une couche mince de type discontinu mais en continu dans un microréacteur électrochimique (Kane, thèse, 2005).

3) Régénération chimique et photochimique

Bien que marginale, l'approche chimique et photochimique pour la régénération de NADH a fait l'objet de quelques travaux de recherche. Historiquement, la réduction de NAD^+ par le dithionite de sodium NaS_2O_4 représente l'une des toutes premières méthodes mise au point (Lehninger, 1957). Bon marché, cette technique présente cependant l'inconvénient d'être très peu sélective. Ainsi, le dithionite de

sodium peut réduire aussi bien le cofacteur que les substrats enzymatiques et dénaturer les enzymes elles-mêmes. De plus, le nombre total de cycle obtenu est faible avec un TTN de 100. Cette méthode n'est donc pas adaptée à une régénération *in situ* lors de synthèses.

Plus récemment, l'emploi de catalyseurs métalliques pour la réduction de NAD^+ en NADH par le dihydrogène H_2 a été démontré. Ainsi, Bhaduri *et al.* (1998) utilisent un complexe de platine carbonylé $[\text{Bu}_4\text{N}]_2[\text{Pt}_{12}(\text{CO})_{24}]$ et Wagenknecht *et al.* (2003) un complexe de ruthénium $[\text{RuCl}_2(\text{TPPTS})_2]_2$ (TPPTS=tris(m-sulfonatophenyl)-phosphine). Dans les deux cas, ces catalyseurs présentent une grande sélectivité vis-à-vis de NAD^+ et conduisent à la formation de NADH biologiquement actif. De plus, cette réaction est catalysée dans des conditions compatibles avec les synthèses enzymatiques classiques : milieux aqueux, pH entre 6,5 et 8,5 et température entre 25 et 65 °C. Enfin, le dihydrogène est très peu coûteux et évite la formation de sous produits de réaction. Cependant, le nombre de cycle total TTN, de l'ordre de 10, est faible à cause de la stabilité du catalyseur métallique dont le coût reste prohibitif.

L'usage courant de milieux aqueux lors de synthèse enzymatique limite généralement l'emploi d'hydrure tel que LiH ou NaH. Pourtant, Stephanson *et al.* (2004) décrivent l'usage d'un nouvel hydrure de silicium comme agent réducteur de NAD^+ . Celui-ci ne réagit pas violemment avec l'eau et des analyses RMN montrent la formation de NADH. Cependant, celui-ci n'est pas mis en œuvre dans une réaction enzymatique donc son activité biologique reste à démontrer.

L'approche photochimique de la régénération de NADH est des plus complexes, puisqu'elle implique en général l'emploi d'une enzyme, d'un médiateur redox, d'un donneur d'électrons et d'un photosensibilisateur. Le photosensibilisateur, sous l'effet de la lumière, va s'oxyder et réduire le médiateur redox. Au contact de l'enzyme, le médiateur réduit va alors régénérer NADH. Le donneur d'électrons va servir à régénérer le photosensibilisateur. Mandler *et al.* (1986) emploient ainsi le complexe

tris(bipyridine)ruthenium(II) comme photosensibilisateur couplé à un médiateur méthyl viologène et à une enzyme *ferrédoxine réductase*. Le donneur d'électrons final est le 2-mercaptoéthanol (cf figure I.9).

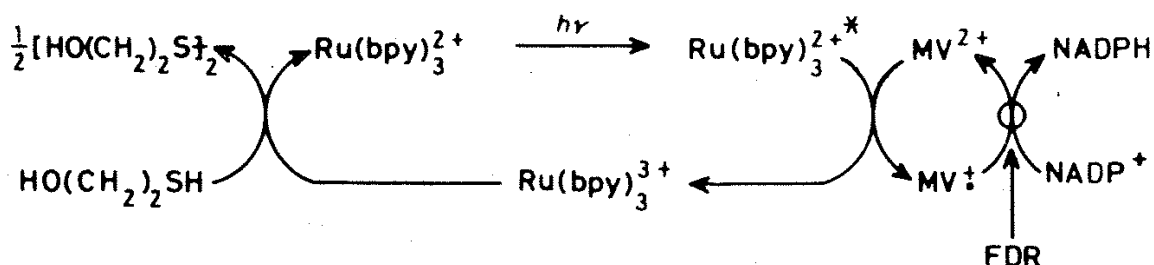


Figure I.9 : Mécanisme de régénération photochimique de NADH selon Mandler et al (1986).

Ce système de régénération *in situ* est appliqué avec succès aux synthèses enzymatiques du butan-2-ol, du lactate, de l'alanine et de l'acide glutamique. Goren et al. utilisent également le méthyl viologène comme médiateur redox et remplace le photosensibilisateur par du sulfure de cadmium et le donneur d'électrons par du formate (Goren, 1988). Prometteuses il y a quelques années, les méthodes photochimiques ont été délaissées en raison de leur complexité tant au niveau du mécanisme réactionnel lui-même que de l'appareillage nécessaire (source lumineuse et réacteur transparent).

4) Récapitulatif

Ce tableau récapitulatif permet de mettre en parallèle les avantages et inconvénients de chaque méthode de régénération de NADH.

| Méthode de régénération | Avantages | Inconvénients |
|-------------------------|--|---|
| Enzymatique | <ul style="list-style-type: none"> -Sélectivité -Compatible avec les synthèses enzymatiques <i>in situ</i> -Suivi aisé des réactions -Vitesse élevée | <ul style="list-style-type: none"> -Coût des enzymes -Sensibilité chimique et thermique -Immobilisation enzymatique complexe et/ou séparation des produits |
| Biologique | <ul style="list-style-type: none"> -Coût des catalyseurs (cellules) et substrat de régénération (ex : glucose) | <ul style="list-style-type: none"> -Productivité/activité enzymatique faible -Stabilité des cellules variables -Complexité de la séparation des produits -Faible sélectivité et pureté optique. |
| Electrochimique | <ul style="list-style-type: none"> -Coût de l'électricité -Pas de réactifs -Suivi aisé des réactions -Séparation aisée du produit d'intérêt | <ul style="list-style-type: none"> -Appareillage complexe -Sélectivité faible en réduction -Passivation des électrodes -Besoin de médiateurs rédox, voire d'enzymes |
| Chimique | <ul style="list-style-type: none"> -Coût des réactifs -Pas d'enzyme supplémentaire | <ul style="list-style-type: none"> -Sensibilité chimique des enzymes de synthèse -Rendement faible -Séparation des produits |
| Photochimique | <ul style="list-style-type: none"> -Pas d'enzyme supplémentaire | <ul style="list-style-type: none"> -Appareillage complexe -Stabilité du cofacteur et des enzymes -Molécules photosensibles |

Tableau I.2 : Récapitulatif des méthodes de régénération du cofacteur NADH

5) Conclusion

Un nombre important de procédés de régénération du cofacteur NADH ont été proposés ces dernières décennies. Evaluer leurs efficacités et comparer leurs performances s'avère une tâche délicate.

Deux critères principaux, définis par Chenault *et al.* (1986) sont retenus par la majorité des auteurs, le nombre de cycle TN et le nombre de cycle total TTN. Le TTN représente le nombre de cycles réaction/régénération que va subir le cofacteur pendant toute la durée de la synthèse. De fait, il est impacté par la perte de cofacteur, soit par dégradation (chimique, photochimique, thermique), soit par une mauvaise sélectivité vis-à-vis de la forme active de NADH. La dégradation du système de régénération (réactifs, catalyseurs, médiateurs...), voire du système de synthèse enzymatique lui-même peut également être à l'origine d'un faible TTN.

De plus, il existe un certain nombre de biais lorsque l'on compare deux techniques entre elles. En effet, outre le mécanisme réactionnel de régénération, le choix de sa mise en œuvre (réacteur discontinu, couche mince, réacteur continu à membrane d'ultrafiltration...), va grandement influencer le TTN. D'autres facteurs encore, comme le choix de la réaction modèle de synthèse ou des conditions opératoires (concentration, température, débits, recyclage...) doivent être examinés avec soin. Par exemple, diminuer la quantité de cofacteur va généralement conduire à une augmentation du TTN au détriment de la productivité.

Le TTN n'est donc pas le seul critère influençant le coût économique d'une technique de régénération. Dans le cas des procédés à enzyme couplés, le coût de l'enzyme elle-même est bien souvent du même ordre de grandeur que le cofacteur. De plus, son activité et sa durée de vie vont varier selon les conditions opératoires. Enfin, les coûts d'isolation et de purification du produit d'intérêt vont là aussi être variables selon la technique retenue.

Ainsi, le TTN apporte une indication importante sur la viabilité d'un système de régénération *in situ*, pris parmi d'autres critères. Il n'existe, à l'heure actuelle, aucune solution parfaite. Il y a toujours des interactions entre la technique de régénération et la synthèse enzymatique elle-même, et l'objectif consiste souvent à les minimiser afin d'optimiser séparément chacun des systèmes. La nature du solvant doit également être prise en compte.

Ces dernières années, les techniques de régénération enzymatique semblent avoir pris le pas sur les techniques électrochimiques, chimiques et photochimiques ou biologiques. Elles présentent en général les meilleures sélectivités vis-à-vis de la forme active de NADH et les meilleures compatibilités avec les enzymes de synthèse. De plus, elles ne nécessitent pas d'appareillage lourd comme les méthodes photochimiques ou électrochimiques.

La technique la plus employée à l'échelle du laboratoire, et la seule utilisée industriellement, emploie le formate et la *formate déshydrogénase*. Développé par Kula et Pohl, elle leur a valu le Prix Allemand du Futur en 2002 (Kula, 2002).

Afin d'assurer encore une meilleure viabilité économique à ce système, l'immobilisation de la *formate déshydrogénase* semble une idée séduisante à plusieurs égards. Les différentes techniques d'immobilisation enzymatique vont donc faire l'objet du paragraphe suivant.

III. Techniques d'immobilisation enzymatique

Par définition, un catalyseur augmente la vitesse à laquelle un système atteint son équilibre thermodynamique en abaissant l'énergie d'activation, sans pour autant être consommé durant la réaction. Celui-ci se doit donc d'être réutilisable lors de plusieurs cycles catalytiques. Si celui-ci est dissous dans le milieu réactionnel, il est difficile de le réutiliser ou de le retenir dans le cas d'un procédé en continu. L'immobilisation enzymatique tend, entre autres, à résoudre ce problème.

En règle générale, l'immobilisation de l'enzyme permet également de stabiliser l'enzyme et d'augmenter ainsi sa durée de vie. Il est communément admis que la plupart des techniques d'immobilisation vont avoir tendance à figer la structure tridimensionnelle de l'enzyme. En effet, c'est cette structure qui est responsable des propriétés catalytiques de ces protéines, aussi sa déformation est le plus souvent à l'origine de la désactivation au cours du procédé enzymatique.

L'activité enzymatique initiale a proprement parlé, aura tendance à diminuer par rapport à l'enzyme en solution, lors de l'immobilisation, mais des exemples contraires existent dans la littérature. L'enzyme *glucose oxydase* immobilisée dans une matrice de Nafion modifié ou de chitosan modifié, par exemple, offre une meilleure activité qu'en solution (Klotzbach, 2006). L'immobilisation peut également servir à diminuer la sensibilité de l'enzyme vis-à-vis de son environnement, permettant ainsi son emploi dans des conditions opératoires plus agressives tel que des températures élevées, des pH extrêmes, d'importantes concentrations en substrat ou l'emploi de solvants organiques (Hanefeld, 2009). Plus rarement, l'immobilisation peut induire un changement de spécificité aux substrats, d'énantiosélectivité ou de réactivité (Mateo, 2007).

Dans le cas des enzymes insolubles, dans des solvants hydrophobes par exemple, l'immobilisation permet aussi d'améliorer la dispersion du catalyseur et d'éviter son agrégation, assurant une meilleure accessibilité des substrats à l'enzyme. Dans le cas des milieux bi-phasiques gaz-liquide, l'enzyme peut être protégée des bulles de gaz souvent à l'origine de sa désactivation (Bhaduri, 1998).

Le choix de la méthode d'immobilisation répond à de nombreux critères. Cependant, obtenir une large surface spécifique est un paramètre essentiel commun à toutes les méthodes. En effet, lors de l'immobilisation, la réaction enzymatique, devient, de fait, hétérogène, ce qui peut induire des limitations dues au transfert de matière au sein d'un réacteur, par exemple, d'où la nécessité de garantir une large surface de contact, *via* des particules de faibles tailles ou des matrices poreuses.

Il n'existe pas de méthode générale applicable systématiquement lors du choix d'une technique d'immobilisation. Malgré les nombreux efforts pour rationaliser ce choix, la démarche actuelle reste empirique. Cependant, les paramètres principaux à prendre en compte restent valable pour l'ensemble des méthodes : interactions entre le support et l'enzyme, stabilité chimique et mécanique du catalyseur immobilisé, rétention de l'enzyme et accessibilité des substrats. Hanefeld *et al.* (Hanefeld, 2009) ont récemment résumé l'ensemble de ces paramètres d'un point de vue qualitatif (tableau I.10).

| |
|---|
| <p>✓ Enzyme :</p> <ul style="list-style-type: none"> -Taille de l'enzyme -Souplesse de conformation spatiale nécessaire au mécanisme enzymatique -Point isoélectrique -Fonction chimique de surface et densité de charges -Stabilité dans les conditions de l'immobilisation -Présence de parties hydrophobe, hydrophile -Présence d'additifs |
| <p>✓ Support :</p> <ul style="list-style-type: none"> -Organique ou inorganique -Hydrophile ou hydrophobe -Charges de surface -Fonctionnalisation de la surface -Stabilité chimique et mécanique -Surface spécifique -Porosité ou taille de particule -Coût de l'immobilisation |
| <p>✓ Facteur spécifique à la réaction enzymatique :</p> <ul style="list-style-type: none"> -Solvant de réaction -Limitation par diffusion -Inhibition de l'enzyme (effets de pH locaux, surconcentration des réactifs ou produits) -Précipitation des produits de réaction -Viscosité du milieu |

Tableau I.10 : Principaux paramètres à prendre en compte lors de la mise au point d'une technique d'immobilisation enzymatique d'après Hanefeld et al. (Hanefeld, 2009)

Ce chapitre a pour objectif de passer en revue, de manière non exhaustive, les différentes méthodes d'immobilisation existantes, en focalisant l'attention sur, d'une part, les travaux spécifiques à la *formate déshydrogénase* lorsqu'ils existent, et d'autre part, les performances remarquables en termes d'activité et de stabilité enzymatique. Il sera divisé en trois parties traitant respectivement de l'immobilisation par adsorption, par liaisons covalentes et par inclusion dans une matrice.

1) Immobilisation par adsorption

Deux types d'interactions faibles peuvent être responsables de la fixation d'une protéine sur un support. D'une part, les enzymes contenant une large zone hydrophobe, peuvent interagir avec un support lui-même hydrophobe *via* les forces de van der Waals. D'autre part, les protéines plutôt hydrophiles, qui représentent la grande majorité des enzymes, vont plutôt avoir tendance à s'adsorber sur des supports hydrophiles *via* des liaisons hydrogènes.

Certaines enzymes de la famille des lipases comportent de larges zones hydrophobes à leur surface et présentent de plus la particularité d'être très déformables. Ces propriétés ont été exploitées afin de modifier leurs activités et leurs énantiosélectivités en les immobilisant par adsorption sur des supports hydrophobes. Ainsi, Rotticci *et al.* fixent une lipase B issue de *Candida antarctica* sur des billes de polypropylène et utilise le système résultant à la résolution d'un mélange racémique de seudenol avec une augmentation d'activité et d'énantiosélectivité par rapport à l'enzyme libre (Rotticci, 2000).

En général, les enzymes présentent diverses fonctions polaires à leurs surfaces ce qui leur confère un caractère plutôt hydrophile. Ainsi, la majorité des

supports d'adsorption étudiés sont hydrophiles. C'est le cas des Celites, qui sont des dérivés de silices à porosité variables. La Celite R-633, par exemple, est employée afin d'immobiliser une lipase pour la résolution d'un racémique de polyméthacrylate. Outre ces propriétés, intéressantes en termes de quantités d'enzyme adsorbables et/ou de maintien d'activité enzymatique, ce support permet aussi d'adsorber les traces d'eau présentes dans le solvant de synthèse, responsable d'inhibition enzymatique dans le cas de cette lipase (Veum, 2004).

Mateo et al., quant à eux, ont développé un matériau composite dans le but d'adsorber des enzymes de manière réversible. Il s'agit d'un mélange de polyéthylénimine (PEI) et de glyoxyl-agarose dont la formulation est optimisée pour maximiser la quantité d'enzyme adsorbée (Mateo, 1999). L'adsorption de trois enzymes distinctes, une *lipase*, une *galactosidase* et une *D-aminoacide oxydase* démontre la versatilité d'un tel support. Le caractère facilement réversible de cette adsorption constitue un avantage certain. En effet, une fois l'enzyme désactivée, le support peut être réutilisé après désorption à l'aide d'une solution à forte force ionique. Ceci est particulièrement intéressant dans le cas de réacteurs complexes, puisque le support peut être régénéré *in situ*.

Cette matrice d'immobilisation a par la suite été reprise en 2007 par Bolivar et al. afin d'immobiliser une *formate déshydrogénase*. La matrice de PEI et de glyoxyl-agarose est efficace pour maintenir l'activité enzymatique puisque environ 100% de l'activité est conservée après adsorption par rapport à l'enzyme en solution. Cependant, aucun effet stabilisateur n'est obtenu puisque la durée de vie de l'enzyme reste identique à celle en solution, et la désactivation par les solvants organiques reste problématique. A l'inverse, sur un support de glyoxyl-agarose pur, seul 30% de l'activité enzymatique est maintenue après immobilisation mais la stabilité est nettement augmentée avec une durée de vie jusqu'à 15 fois supérieure à pH 7 (Bolivar, 2007).

Il est également possible d'adsorber des protéines sur des interfaces métalliques, fonctionnalisées ou non. Par exemple, Parra et al. ont immobilisé une *cholesterol oxydase* sur une surface d'or. L'adsorption est rapide (10 min) et spontanée (simple trempage). Les études par microbalance à quartz et AFM (microscopie à force atomique) indiquent la formation d'une monocouche peu organisée de protéines. Ceci induit une activité enzymatique moindre, l'orientation de la protéine sur la surface n'autorisant pas toujours l'accès des substrats au site actif de l'enzyme (Parra, 2007).

Afin de palier à ce problème, une technique consiste à former une monocouche auto-assemblée (ou SAM, pour *self-assembled monolayer*) préalablement à l'adsorption de l'enzyme. Il s'agit généralement de molécule présentant une longue chaîne alkyl et une fonction thiol –SH à une de ces extrémités. Mis en contact avec une surface métallique, typiquement, de l'or, la fonction thiol va s'adsorber fortement sur la surface, par chimisorption. La monocouche ainsi formée va s'organiser spontanément grâce aux interactions hydrophobes des chaînes alkyl entre elles. L'autre extrémité de la chaîne alkyl peut également être fonctionnalisée pour favoriser l'adsorption d'une enzyme donnée de manière organisée. Ainsi, Barrias et al. (2005) forment une SAM sur une surface d'or à l'aide d'une molécule de formule $\text{SH}-(\text{CH}_2)_{10}-\text{X}$, X étant soit une fonction méthyl, acide carboxylique ou alcool. Sur ce support, est adsorbé une *glucocerebrosidase* de manière réversible, l'objectif étant de réaliser un support pour vectoriser des enzymes à but thérapeutique. Le paragraphe suivant montrera que les SAM sont aussi très utilisées pour immobiliser des enzymes de manière covalente.

Les mécanismes d'adsorption des protéines sont des phénomènes complexes affectés par de nombreux facteurs. La vitesse d'adsorption et la quantité d'enzyme adsorbée sont déterminées par la nature et la concentration de l'enzyme, la nature du support et du solvant, le pH, la force ionique et la température. L'absence de modification chimique des enzymes constitue un avantage important de cette technique, l'immobilisation se faisant dans des conditions opératoires douces.

Cependant, ceci ne garantit pas que l'activité enzymatique soit entièrement conservée, notamment à cause des problèmes d'orientation de l'enzyme sur le support ou de déformation de la protéine. La possibilité d'obtenir des systèmes d'immobilisation réversibles est également intéressante, notamment dans les cas où le support est onéreux, comme de l'or par exemple. En revanche, les interactions faibles mises en jeu (forces de van der Waals, liaisons hydrogène) impliquent que l'immobilisation sera peu résistante aux contraintes mécaniques et chimiques.

2) Immobilisation par liaisons covalentes

Ce type d'immobilisation implique des liaisons plus fortes que l'adsorption. Le relargage d'enzymes immobilisées s'en trouve diminué, évitant ainsi la contamination des produits d'intérêt. En milieu aqueux, où la polarité du solvant diminue la force des interactions faibles, comme les liaisons hydrogènes, cette technique est souvent préférée. De multiples liaisons covalentes vont réduire la souplesse de conformation de l'enzyme, ce qui permet de limiter la désactivation, notamment lorsque les conditions de synthèse sont dures. Cependant, certaines enzymes impliquent des mécanismes réactionnels nécessitant cette souplesse de conformation. Dans ce cas, l'immobilisation par liaisons covalentes peut, au contraire, induire une désactivation.

Les fonctions chimiques de surface de l'enzyme vont être mises à contribution pour créer les liaisons covalentes avec un support. De part leurs tailles importantes, de l'ordre de 10^4 Da (Dalton, ou g.mol^{-1}), et la diversité de leurs fonctions chimiques, il est très difficile de contrôler quelles parties des enzymes vont être impliquées dans ces liaisons. De même, lors d'une réaction d'immobilisation, l'ensemble des protéines ne seront pas toutes liées de la même manière. Cependant, les fonctions cibles, que l'on retrouve en général à la surface des enzymes sont connues (Basso, 2007) :

-les amines -NH_3 , en tant que nucléophile, elles peuvent être liées à des aldéhydes ou des époxydes.

-les carbodiimides RN=C=NR , peuvent se lier avec des acides carboxyliques du support, et inversement.

-les motifs glycoliques peuvent réagir avec des amines.

Des molécules dédiées servent à faire le lien entre l'enzyme et le support. La plus utilisée est sans conteste le glutaraldéhyde et ses dérivés. Il s'agit d'une chaîne carbonée linéaire de cinq atomes comportant une fonction aldéhyde à chacune de ses extrémités, permettant la réactivité de la molécule avec la surface des enzymes et les supports préalablement fonctionnalisés. La longueur de la chaîne carbonée permet de jouer sur la flexibilité laissée à l'enzyme, plus la chaîne est longue, plus l'enzyme aura de liberté dans sa conformation (Hanefeld, 2009).

Des tentatives d'immobilisation d'une *formate déshydrogénase* par cette technique existe dans la littérature. Mori et al. (2008) lient l'enzyme à des billes de verres préalablement fonctionnalisées par du propylamine à l'aide de glutaraldehyde afin de développer un système d'analyse en ligne du formate dans des produits agroalimentaires. Bien que l'enzyme soit correctement retenue par le support, seul 7% de l'activité enzymatique est conservée après immobilisation. Bolivar et al. (2007), quant à eux, immobilisent une *formate déshydrogénase* via du glutaraldéhyde sur un support de glyoxyl agarose. En jouant sur la température à laquelle l'immobilisation est réalisée, 15% d'activité enzymatique est conservée par rapport à l'enzyme en solution. De plus, l'enzyme est stabilisée d'un facteur 5 à pH acide et d'un facteur 50 à pH basique. La grande sensibilité physicochimique des *formates déshydrogénases* restreint fortement le panel des techniques envisageables.

Il est également possible de former des SAMs (*self-assembled monolayer*), généralement sur des surfaces d'or, et de lier de manière covalente l'enzyme à la monocouche. Cela présente l'avantage d'orienter de manière plus uniforme les enzymes tout en les laissant plus accessibles aux substrats que lors de l'immobilisation dans une matrice poreuse, par exemple. Ainsi, Willner et al. (1992) forment une monocouche auto-assemblée d'acide cystéique sur une surface d'or avant de lier une *glutathione reductase* à l'amine de l'acide cystéique, tout en conservant 100% de l'activité enzymatique.

Enfin, la réticulation enzymatique (*crosslinking*) est une technique d'immobilisation par liaisons covalentes un peu particulière. En lieu et place d'un support, les enzymes vont être liées entre elles pour former leur propre support, appelé CLEA (*cross linked enzyme aggregates*). La technique consiste d'abord à faire précipiter une enzyme en solution sous forme cristalline, puis d'ajouter un agent liant, le plus souvent, là aussi, du glutaraldéhyde (cf figure I.11, Hanefeld, 2009).

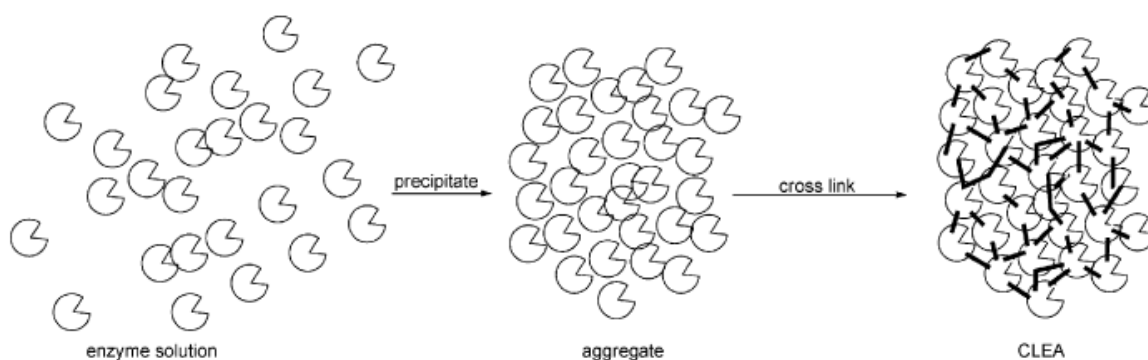


Figure I.11 : Principe de la réticulation enzymatique d'après Hanefeld et al. (Hanefeld, 2009)

Hara et al. (2008), par exemple, réalisent des CLEA de l'enzyme lipase PS à l'aide de glutaraldéhyde. Les cristaux obtenus servent à catalyser l'acylation

énantiosélective du 1-phenyléthanol, du 1-(2-furyl)ethanol et du 1-amino-2-phenylethanol. 174% d'activité enzymatique par rapport à l'enzyme en solution sont obtenus ce qui constitue une performance remarquable. En revanche, la stabilité s'en trouve fortement diminuée.

3) Immobilisation par encapsulation

L'immobilisation au sein d'une matrice, autrement appelée encapsulation, consiste à fixer l'enzyme par rétention stérique dans une matrice poreuse. Cependant, cela n'exclut pas la présence d'interactions faibles (liaison H, forces de van der Waals, adsorption) entre la protéine et le support d'immobilisation. L'absence de réactions chimiques avec l'enzyme peut être un avantage certain pour les plus sensibles d'entre elles. Ceci implique que la matrice doit présenter une inertie chimique importante en plus d'une grande résistance mécanique.

3.1) Immobilisation sol-gel

Le développement des procédés sol-gel permet d'obtenir des matériaux macroporeux à base de silice, présentant une excellente inertie chimique. Le principe consiste à faire passer un système de l'état de colloïde en phase liquide, à l'état de gel, en phase solide par polymérisation. Le catalyseur enzymatique est ajouté en phase liquide, avant condensation du gel. La première étape consiste en l'hydrolyse acide d'un tetraalkoxysilane (sol-gel hydrophile) ou d'un alkyltrialkoxysilane (sol-gel hydrophobe), ce qui va déclencher la condensation du gel. Les pores sont alors remplis de solvant, généralement d'eau et d'alcool, et forment ce que l'on appelle un aquagel. Lorsque celui-ci est séché, les forces capillaires font s'effondrer la structure poreuse de l'aquagel pour former un xérogel moins poreux. Alternativement, le solvant peut être remplacé par de l'acétone ou du CO₂ supercritique avant séchage. Lors de l'évaporation,

beaucoup plus rapide, la structure originelle de l'aquagel est conservée, et l'on obtient un aérogel dont la porosité est augmentée (Pierre, 2004).

La méthode sol-gel permet de générer des microstructures et des propriétés très variées, en contrôlant des paramètres (choix de l'alkoxysilane, composition du solvant, pH, température, méthode de séchage) lors de la synthèse du sol-gel, ce qui explique l'attention importante portée à cette méthode dans la littérature (Wang, 1999). La structure à base de silice conduit à des matériaux à haute biocompatibilité qui peuvent être employés sous forme monolithique, de films, de poudre ou encore de fibres. Cependant, leurs résistances mécaniques peuvent poser problème, et l'hydrolyse acide qui précède la condensation produit des alcools qui conduisent souvent à la dénaturation des enzymes les plus sensibles (Avnir, 2006). Gill et al. (1998) développent un sol-gel de poly(glyceryl silicate) pour immobiliser 14 enzymes différentes, tel que *glucose oxydase*, *phospholipase D*, *pyruvate décarboxylase* ou *glycerol 3-phosphate oxidase*. Les activités enzymatiques obtenues, entre 83 et 98% par rapport aux protéines en solution, sont remarquables sur une si large gamme de protéines. De plus, ce matériau présente une porosité très importante, avec un volume de pore de 0,4 à 0,9 mL.g⁻¹, qui garantit une bonne diffusion des substrats au sein du polymère. Enfin, le relargage est faible avec un maximum de 13% de perte après 10 mois de stockage dans un tampon phosphate. Soares et al. (2004) développent un sol-gel plus hydrophobe, à base de methyltrimethoxysilane, afin d'immobiliser une *lipase* issue de *Candida rugosa*. En effet, cette enzyme, comme de nombreuses lipases, présente de larges zones hydrophobes à sa surface. L'ajout d'additifs, notamment le polyéthylène glycol, permet d'élargir la taille des pores. Cependant le matériau obtenu est moins poreux que le précédent avec un volume de pores inférieur à 0,25 mL.g⁻¹.

3.2) Immobilisation au sein d'un polymère électro-généré

Les polymères électro-générés permettent l'encapsulation de biomolécules, particulièrement d'enzymes. Le principe consiste à appliquer le potentiel approprié pour l'électro-génération du polymère à une électrode de travail immergée dans une solution contenant le monomère et l'enzyme. La protéine est alors piégée dans le réseau du polymère au fur à mesure de sa croissance. L'avantage de cette méthode est que le film est facilement préparé en une seule étape, l'enzyme ne subit pas de réaction chimique susceptible de modifier son activité et l'épaisseur du film peut être facilement contrôlée *via* la mesure de la quantité d'électricité échangée lors de l'électropolymerisation (Cosnier, 1999). Les formules chimiques des principaux polymères que l'on retrouve dans la littérature sont illustrées sur la figure I.12.

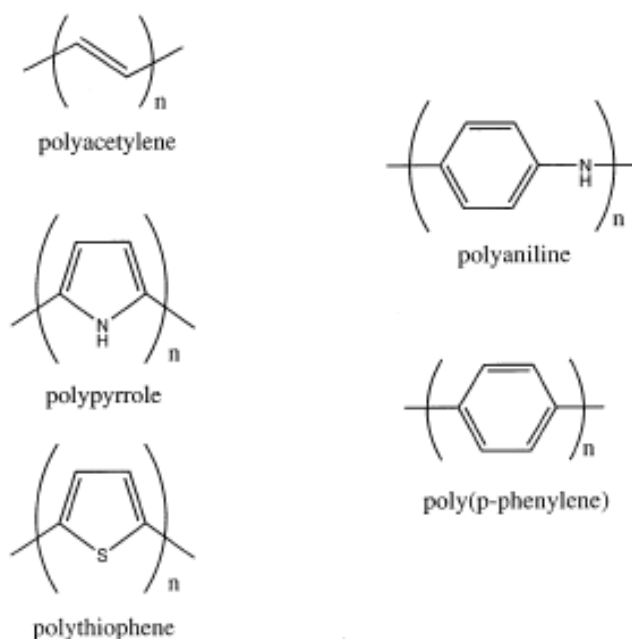


Figure I.12 : Formules chimiques des polymères électro-générés utilisés pour l'immobilisation enzymatique d'après Cosnier et al. (1999)

Gros et al. (1995) immobilisent ainsi une *glucose oxydase* dans un film de polypyrrole électro- généré sur une électrode de platine afin de développer un biocapteur

électrochimique à glucose. Il est démontré que 90% de l'activité enzymatique est bien due à l'enzyme piégée dans le film de 250 nm d'épaisseur. La même application est développée par Malitesta et al. (1990) à l'aide d'un film de polyphenylènediamine électro-généré de seulement 10 nm d'épaisseur. Dans ce cas, le mécanisme d'immobilisation est incertain et les auteurs postulent l'existence de deux phénomènes d'immobilisation, l'adsorption sur le film et l'encapsulation au sein du polymère. Bartlett et al. (1998) mettent d'ailleurs en pratique ces deux phénomènes pour développer un capteur électroenzymatique à peroxyde d'hydrogène. Le principe consiste à électro-générer un premier film de polyaniline sur une électrode de carbone sur lequel est adsorbé par trempage une *peroxydase*. Un second film électro généré dans lequel est encapsulé la même enzyme est alors ajouté sur le premier afin d'augmenter la réponse du capteur.

3.3) Immobilisation au sein d'un polymère

Le Nafion® (cf figure I.13) est un polymère développé par la société Dupont dans les années 60, initialement pour des applications en pile à combustible, notamment pour le programme spatial américain (Banerjee, 2004).

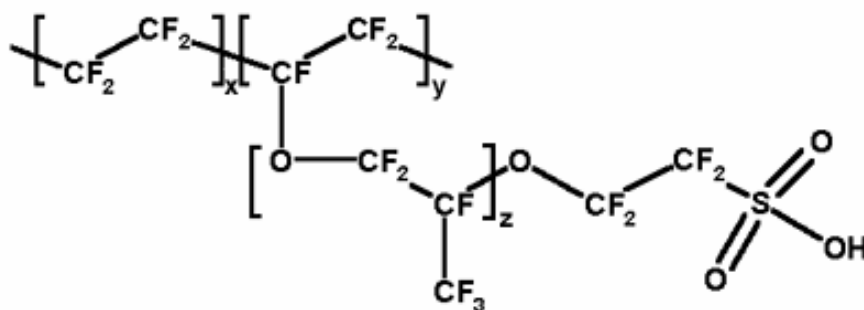


Figure I.13 : Formule chimique du Nafion®

Son acidité importante a longtemps limité son emploi en tant que matrice d'immobilisation enzymatique. De plus, la faible taille de ses pores interdit la diffusion de larges espèces, tel que des cofacteurs enzymatiques. Depuis les années 2000 cependant, une technique de codéposition du Nafion® avec des sels de tetraalkylphosphonium et de tetraalkylammonium a été développée par l'équipe du professeur Minteer pour palier à ces problèmes (Schrenk, 2002 ; Moore, 2005 ; Akers, 2005 ; Klotzbach, 2006). Ces ions sont en fait échangés avec le proton labile de l'acide sulfonique du Nafion®. Il en résulte une baisse de l'acidité du polymère ainsi qu'un changement de structure micellaire induisant un élargissement des pores. Ceci permet de faciliter la diffusion de larges molécules au sein du Nafion®. Cette nouvelle matrice est appliquée avec succès à l'immobilisation de cinq enzymes, une *alcool déshydrogénase*, une *formate déshydrogénase*, une *lactate déshydrogénase*, une *glucose déshydrogénase* et une *formaldéhyde déshydrogénase* (Klotzbach, 2008). L'activité enzymatique de la *glucose déshydrogénase* est augmentée d'un facteur deux après immobilisation. Cependant, l'activité des autres enzymes n'est vérifiée que d'un point de vue qualitatif et n'est pas mesurée.

Le chitosan est un polyaminosaccharide naturel, dérivé de la chitine, souvent employé comme support d'immobilisation. La chitine est la 2^{ème} matière biologique la plus abondante sur Terre après la cellulose. Il s'agit d'un biopolymère qui constitue la carapace des crustacés et l'exosquelette des insectes. Le chitosan est un dérivé de la chitine obtenue par désacétylation, c'est-à-dire le remplacement de la fonction acétyl $-\text{COCH}_3$ par un proton pour former une amine primaire. Le degré de désacétylation est variable d'un produit à l'autre mais, pour être considéré comme du chitosan, la chitine doit être désacétylée à plus de 80%. Les formules développées sont représentées sur la figure I.14.

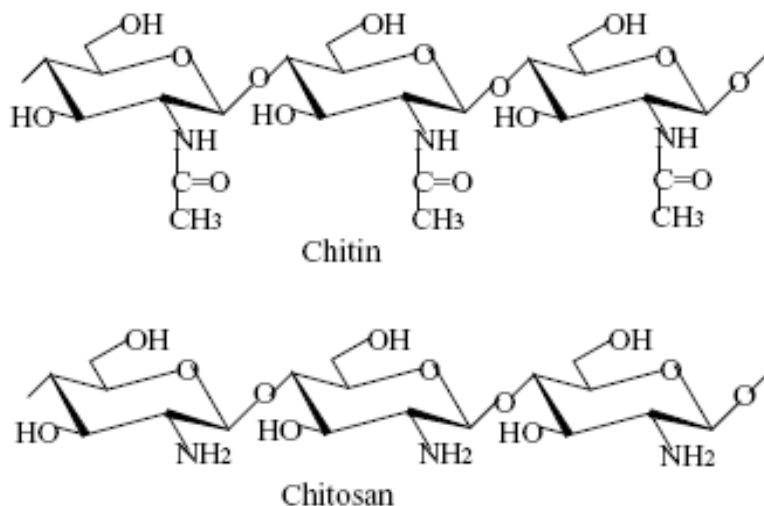


Figure I.14 : Formule chimique de la chitine et du chitosan d'après Krajewska et al (2004).

Le chitosan offre une grande biocompatibilité, des propriétés anti bactériennes, il n'est pas toxique et il présente des affinités avec les protéines. En 2004, Krajewska et al. (2004) dénombraient déjà près de 63 enzymes immobilisées avec succès dans des matrices de chitosan. A titre d'exemple, citons le cas de l'immobilisation de l'enzyme *α -L-arabinofuranosidase* dans une matrice de chitine ou de chitosan. Cette enzyme est employée par l'industrie agro alimentaire pour l'aromatisation de boissons telles que les jus de fruits (Spagna, 1998).

Cependant, l'enzyme formate déshydrogénase n'a jamais pu être immobilisée dans ce type de matrice. Sa désactivation par le support est attribuée à la nature trop hydrophile de la chitine et du chitosan (Cooney, 2008). En 2006 cependant, l'équipe du professeur Minteer (Klotzbach, 2006) propose d'immobiliser une enzyme *glucose déshydrogénase* dans une matrice constituée de dérivés du chitosan, appelés alkylchitosan (cf figure I.15). Ces composés sont connus depuis les années 80 avec les travaux de Yalpani et al. (Yalpani, 1984) mais leurs emplois en tant que matrice d'immobilisation enzymatique n'interviendront que vingt ans plus tard. Le greffage de

chaînes alkyl, de tailles variant entre 4 et 10 carbones, donne un caractère plus hydrophobe au polymère. L'activité enzymatique s'en trouve augmentée comparée à la même enzyme immobilisée dans du chitosan non modifié.

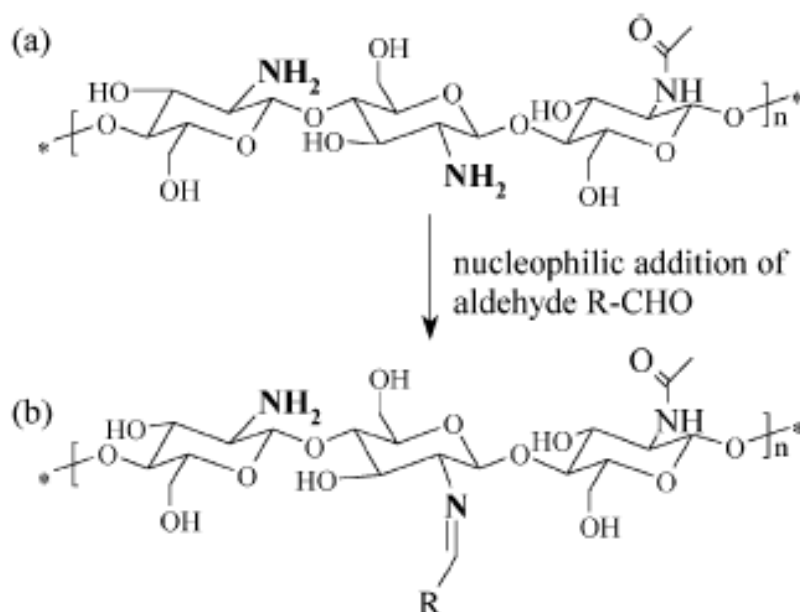


Figure I.15 : Modification hydrophobe du chitosan par la greffe de chaîne alkyl

Deux ans plus tard, en 2008, l'équipe du professeur Minteer élargit avec succès l'application de ce support à cinq déshydrogénases comprenant l'enzyme *formate déshydrogénase* (Klotzbach, 2008). Leurs travaux visent le développement de biopiles à combustible, et à ce titre, ils s'intéressent principalement à l'amélioration du transport de matière à travers la matrice. En effet, ce paramètre limite souvent les densités de courant de ces dispositifs. Les résultats obtenus indiquent une altération importante de la structure poreuse du polymère. Les pores s'en trouvent élargis et leur nombre diminue. En termes de transport de matière, l'amélioration est significative pour le transfert de cations, négligeable pour les molécules neutres, et moins rapide pour les anions.

Références

- Akers, N., Moore, C., Minter, S., "Development of alcohol/O₂ biofuel cells using salt-extracted tetrabutylammonium bromide/Nafion membranes to immobilize dehydrogenase enzymes", *Electrochimica Acta*, vol. 50 (2005) 2521-2525.
- Avnir, D., Coradin, T., Lev, O., Livage, J., "Recent bio-applications of sol-gel materials", *Journal of Materials Chemistry*, vol. 16 (2006) 1013-1030.
- Avramescu, A., Noguier, T., Avramescu, M., Marty, J., "Screen-printed biosensors for the control of wine quality based on lactate and acetaldehyde determination", *Analytica Chimica Acta*, vol. 458 (2002) 203-213.
- Baik, H., Kang, C., Jeon, C., Yun, S. "Direct electrochemical regeneration of NADH from NAD⁺ using cholesterol-modified gold amalgam electrode", *Biotechnology Techniques*, vol. 13 (1999) 1-5.
- Banerjee, S., Curtin, D., "Nafion perfluorinated membranes in fuel cells", *Journal of Fluorine Chemistry*, vol. 125 (2004) 1211-1216.
- Barrias, C., Martins, C., Miranda, C., Barbosa, M., "Adsorption of a therapeutic enzyme to self-assembled monolayers: effect of surface chemistry and solution pH on the amount and activity of adsorbed enzyme", *Biomaterials*, vol. 26 (2005) 2695-2704.
- Bartlett, P., Birkin, P., Wang, J., "An enzyme switch employing direct electrochemical communication between Horseradish peroxidase and a poly(aniline) film", *Anal. Chem.*, vol. 70 (1998) 3685-3694.
- Barton, S., Gallaway, J., Atanassov, P., "Enzymatic biofuel cells for implantable and microscale devices", *Chem. Rev.*, vol. 104 (2004) 4867-4886.
- Basso, A., Braiuca, P., Cantone, S., Ebert, C., Linda, P., Spizzo, P., Caimi, P., Hanefeld, U., Degraffi, G., Gardossi, L., "In Silico Analysis of enzyme surface and glycosylation effect as a tool for efficient covalent immobilization of CalB and PGA on Sepabeads", *Adv. Synth. Catal.*, vol. 349 (2007) 877-886.
- Bergel, A., Comtat, M., "Thin-layer spectroelectrochemical study of the reversible reaction between nicotinamide adenine dinucleotide and flavin adenine dinucleotide", *J. Electroanal. Chem.*, vol. 302 (1991) 219-231.

Bhaduri, S., Mathur, P., Payra, P., Sharma, K., "Coupling of catalyses by carbonyl clusters and dehydrogenases: reduction of pyruvate to L-lactate by dihydrogen", *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 120 (1998) 12127-12128.

Bolivar, J., Wilson, L., Ferrarotti, S., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J., Mateo, C., "Evaluation of different immobilization strategies to prepare an industrial biocatalyst of formate dehydrogenase from *Candida boidinii*", *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 40 (2007) 540-546.

Bommarus, A., Schwarm, M., Karlheinz, D., "Biocatalysis to amino acid-based chiral pharmaceuticals-examples and perspectives", *J. Molecular Catalysis B: enzymatic*, vol. 5 (1998) 1-11

Cantet, J., Bergel, A., Comtat, M., "Coupling of the electroenzymatic reduction of NAD^+ with a synthesis reaction", *Enzyme and microbial technology*, vol. 18 (1996) 72-79.

Chenault, H., Whitesides, G., "Regeneration of nicotinamide cofactors for use in organic synthesis", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 14 (1987) 147-194.

Cooney, M., Lau, C., Windmeisser, M., Liaw, B., Klotzbach, T., Minteer, S., "Design of chitosan gel pore structure: towards enzyme catalyzed flow-through electrodes", *Journal of Materials Chemistry*, vol. 18 (2008) 667-674.

Cosnier, S., "Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. A review", *Biosensors Bioelectronics*, vol. 14 (1999) 443-456.

Craeli, W., "The bionic man: restoring mobility", *Science*, vol. 295 (2002) 1018-1021.

Délécouls-Servat, K., Basséguy, R., Bergel, A., "Membrane electrochemical reactor (MER) : application to NADH regeneration for ADH-catalysed synthesis", *Chemical Engineering Science*, vol. 57 (2002) 4633-4642.

Devaux-Basseguy, R., Bergel, A., Comtat, M., "Potential applications of NAD(P)-dependent oxidoreductases in synthesis : a survey", *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 20 (1997) 248-258.

Dicosimo, R., Wong, C., Daniels, L., Whitesides, G., "Enzyme-catalysed organic synthesis: Electrochemical regeneration of NAD(P)H from NAD(P) using methyl viologen and flavoenzymes", *J. Org. Chem.*, vol. 46 (1981) 4622-4623.

Dimopoulos, M., Kastritis, E., "Thalidomide in the treatment of multiple myeloma", *Best practice and research clinical haematology*, vol. 20 (2007) 681-699

Duetz, W., Beilen, J., Witholt, B., "Using proteins in their natural environment: potential and limitations of microbial whole-cell hydroxylations in applied biocatalysis", *Current opinions in biotechnology*, vol. 12 (2001) 419-425.

Endo, T., Koizumi, S., "Microbial conversion with cofactor regeneration using genetically engineered bacteria", *Adv. Synth. Catal.*, vol. 343 (2001) 521-526.

Fisher, R., Fenton, J., Iranmahboob, J., "Electro-enzymatic synthesis of lactate using electron transfer chain biomimetic membranes", *J. Membrane Science*, vol. 177 (2000) 17-24.

Garcia Costas, A., White, A., Metcalf, W., "Purification and characterization of a novel phosphorus-oxidizing enzyme from *Pseudomonas stutzeri* WM88", *J. Biol. Chem.*, vol. 276 (2001) 17429-17436.

Ghindilis, A., Atanasov, P., Wilkins, E., "Enzyme-catalyzed direct electron transfer: fundamentals and analytical applications", *Electroanalysis*, vol.9 (1997) 661-674

Gill, I., Ballesteros, A., "Encapsulation of biological within silicate, siloxane, and hybrid sol-gel polymers: an efficient and generic approach", *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 120 (1998) 8587-8598.

Goren, Z., Lapidot, N., Willner, I., "Photocatalysed regeneration of NAD(P)H by CdS and TiO₂ semiconductors: applications in enzymatic synthesis", *Journal of Molecular catalysis*, vol. 47 (1988) 21-32.

Gorton, L., "Electrochemistry of NAD(P)⁺/NAD(P)H", A. J. Bard, M. Stratmann Ed., *Encyclopedia of electrochemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, (2002) 67-143.

Gorton, L., Dominguez, E., "Electrocatalytic oxidation of NAD(P)H at mediator-modified electrodes", *Reviews in molecular biotechnology*, vol. 82 (2002) 371-392.

Groger, H., Hummel, W., Buchholz, S., Drauz, K., Nguyen, T., Husken, H., Abokitse, K., "Practical asymmetric enzymatic reduction through discovery of a dehydrogenase-compatible biphasic reaction media", *Org. Lett.*, vol. 5 (2003) 173-176.

Gros, P., Bergel, A., "Improved model of a polypyrrole glucose oxidase modified electrode", *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 386 (1995) 65-73.

Gros, P., Zaborosch, C., Schlegel, H., Bergel, A., "Direct electrochemistry of *Rhodococcus opacus* hydrogenase for the catalysis of NAD^+ reduction", *J. Electroanalytical Chemistry*, vol. 405 (1996) 189-195.

Hanefeld, U., Gardossi, L., Magner, E., "Understanding enzyme immobilization", *Chem. Soc. Rev.*, vol. 38 (2009) 453-468.

Hanefeld, U., Gardossi, L., Magner, E., "Understanding enzyme immobilisation", *Chem. Soc. Rev.*, vol. 38 (2009) 453-468.

Hara, P., Hanefeld, U., Kanerva, L., "Sol-gels and cross-linked aggregates of lipase PS from *Burkholderia cepacia* and their applications in dry organic solvents", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 50 (2008) 80-86.

Hummel, W., Kula, M., "Dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds", *Eur. J. Biochem.*, vol. 184 (1989) 1-13.

Ivnitski, D., Branch, B., Atanassov, P., Apblett, C., "Glucose oxidase anode for biofuel cell based on direct electron transfer", *Electrochemistry communications*, vol. 8 (2006) 1204-1210

Janik, B., Elving, J., "Polarographic behavior of nucleosides and nucleotides of purines, pyridines, and flavins", *Chem. Rev.*, vol. 68 (1968) 295-319.

Kane, C., "Conception et réalisation de microréacteurs électrochimiques – Application à la régénération électroenzymatique de NADH et potentialités en synthèse", Thèse de doctorat de l'Université Paul Sabatier – Toulouse III, (2005).

Katakis, I., Dominguez, E., "Catalytic electrooxidation of NADH for dehydrogenase amperometric biosensors", *Mikrochim. Acta*, vol. 126 (1997) 11-32.

Kataoka, M., Yamamoto, K., Kawabata, H., Wada, M., Kita, K., Yanase, H., Shimizu, S., "Stereoselective reduction of ethyl 4-chloro-3-oxobutanoate by *Escherichia coli* transformant cells coexpressing the aldehyde reductase and glucose dehydrogenase genes", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 51 (1999) 486-490.

Kim, M., Yun, S., "Construction of an electro-enzymatic bioreactor for the production of (R)-mandelate from benzoylformate", *Biotechnology Letters*, vol. 26 (2004) 21-26.

Kim, S., Yun, S., Kang, C., "Electrochemical evaluation of the reaction rate between methyl viologen mediator and diaphorase enzyme for the electrocatalytic reduction of NAD^+ and digital simulation for its voltametric responses", ", *J. Electroanalytical Chemistry*, vol. 465 (1999) 153-159.

Klotzbach, T., Watt, M., Ansari, Y., Minteer, S., "Effects of hydrophobic modification of chitosan and Nafion on transport properties, ion-exchange capacities, and enzyme immobilization", *Journal of Membrane Science*, vol. 282 (2006) 276-283.

Klotzbach, T., Watt, M., Ansari, Y., Minteer, S., "Effects of hydrophobic modification of chitosan and Nafion on transport properties, ion-exchange capacities, and enzyme immobilization", *Journal of Membrane Science*, vol. 282 (2006) 276-283.

Klotzbach, T., Watt, M., Ansari, Y., Minteer, S., "Improving the microenvironment for enzyme immobilization at electrodes by hydrophobically modifying chitosan and Nafion polymers", *Journal of Membrane Science*, vol. 311 (2008) 81-88.

Koeller, K., Wong, C., "Enzymes for chemical synthesis", *Nature*, vol. 409 (2001) 232-240.

Kohlmann, C., Markle, W., Lutz, S., "Electroenzymatic synthesis", *J. Mol. Catalysis*, vol. 51 (2008) 57-72.

Kragl, U., Vasic-Racki, D., Wandrey, C., *Ind. J. Chem.*, vol. 32 (1993) 103.

Krajewska, B., "Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilization: a review", *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 35 (2004) 126-139.

Kula, M., Pohl, M., "Prix Allemand du future 2002", site web : <http://www.deutscher-zukunftspreis.de/en/preistraeger/laureates-2002>

Kulbe, K., Howaldt, M., Schmidt, K., Rothig, T., Chmiel, H., "Rejection and continuous regeneration of the native coenzyme NAD(P)H in a charged ultrafiltration membrane enzyme reactor", *Ann. N. Y. Acad. Sci.* vol. 613 (1990) 820-826

Lehninger, A. L., "Bioénergétique", Ediscience ed. (1969)

Lehninger, A., *Methods Enzymol.*, vol. 3 (1957) 885.

Lupu, A., Compagnone, D., Palleschi, G., "Screen-printed enzyme electrodes for the detection of marker analytes during winemaking", *Analytica Chimica Acta*, vol. 513 (2004) 67-72.

Malitesta, C., Palmisano, F., Torsi, L., Zambonin, P., "Glucose fast-response amperometric sensor based on glucose oxidase immobilized in an electropolymerized poly(o-phenylenediamine) film", *Anal. Chem.*, vol. 62 (1990) 2735-2740.

Mandler, D., Willner, I., "Photosensitized NAD(P)H regeneration systems; Application in the reduction of butan-2-one, pyruvic, and acetoacetic acids and in the reductive amination of pyruvic and oxoglutaric acid to amino acid", *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* (1986) 805-811.

Mateo, C., Abian, O., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J., "Reversible enzyme immobilization via a very strong and nondistorting ionic adsorption on support-polyethylenimine composites", *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 68 (2000) 98-105.

Mateo, C., Palomo, J., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J., Fernandez-Lafuente, R., "Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques", *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 40 (2007) 1451-1463.

Matsuyama, A., Yamamoto, H., Kawada, N., Kobayashi, Y., "Industrial production of (R)-1,3-butanediol by new biocatalysts", *J. Mol. Catalysis*, vol. 11 (2001) 513-521.

Moiroux, J., Elving, P., "Effects of adsorption, electrode material, and operational variables on the oxidation of dihydronicotinamide adenine dinucleotide at carbon electrodes", *Anal. Chem.*, vol. 50 (1978) 1056-1062.

Moore, C., Hackman, S., Brennan, T., Minteer, S., "Effect of mixture casting phosphonium salts with Nafion on the proton exchange capacity and mass transport through the membranes", *Journal of Membrane Science*, vol. 254 (2005) 63-70.

Mori, H., Ohmori, R., "Determination of formate using immobilized formate dehydrogenase in a flow system and its application to analyze the formate content of foodstuffs", *J. Health Science*, vol. 54 (2008) 212-215.

Mori, H., Ohmori, R., "Determination of formate using immobilized formate dehydrogenase in a flow system and its application to analyze the formate content of foodstuffs", *Journal of Health Science*, vol. 54(2) (2008) 212-215.

Nakayama, K., Sato, Z., Tanaka, H., Kinoshita, S., "Production of nucleic acid-related substances by fermentative processes, Part XVII. Production of NAD and nicotinic acid mononucleotide with *Brevibacterium ammoniagenes*", *Agr. Biol. Chem.*, vol. 32 (1968) 1331-1336.

Palmore, G., Bertschy, H., Bergens, S., Whitesides, G., "A methanol/dioxygen biofuel cell that uses NAD⁺-dependent dehydrogenase as catalysts: application of an electro-enzymatic method to regenerate nicotinamide adenine dinucleotide at low overpotentials", *J. Electroanal. Chem.*, vol. 443 (1998) 155-161

Parra, A., Casero, E., Pariente, F., Vazquez, L., Lorenzo, E., "Cholesterol oxydase modified gold electrodes as bioanalytical devices", *Sensors and Actuators B*, vol. 124 (2007) 30-37.

Pierre, A., "The sol-gel encapsulation of enzymes", *Biocatal. Biotransform*, vol. 22 (2004) 145-170.

Radoi, A., Compagnone, D., "Recent advances in NADH electrochemical sensing design", *Bioelectrochemistry*, vol. 76 (2009) 126-134.

Rao, N., Roth, H., "Enzymatic synthesis of (S)-(-)-3-(3,4-dihydroxy-phenyl) lactic acid", *Arch. Pharm.* Vol.321, (1988) 179-180.

Rodkey, F., "Oxidation-reduction potentials of the diphosphopyridine nucleotide system", *J. Biol. Chem.*, vol. 213 (1955) 777-786.

Rotticci, D., Norin, T., Hult, K., "Mass transport limitations reduce the effective stereospecificity in enzyme-catalyzed kinetic resolution", *Org. Lett.*, vol. 2 (2000) 1373-1376.

Ruppert, R., Herrmann, S., Steckhan, E., "Efficient indirect electrochemical in-situ regeneration of nadh:electrochemically driven enzymatic reduction of pyruvate catalyzed by d-ldh", *Tetrahedron Lett.*, vol. 28 (1987) 6583-6586.

Samdani, G., Ondrey, G., "Chiral engineering breaks trough the looking glass", *Chem. Eng.*, vol. 100 (1993) 35-39.

Schmakel, C., Santhanam, K., Elving, P., "Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) and related compounds. Electrochemical redox pattern and allied chemical behavior", *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 97 (1975) 5083-5092.

Schrenk, M., Villigam, R., Torrence, N., Brancato, S., Minteer, S., "Effects of mixture casting Nafion with quaternary ammonium bromide salts on the ion-exchange capacity and mass transport in the membranes", *Journal of Membrane Science* vol. 205 (2002) 3-10.

Siu, E., Won, K., Park, C., "Electrochemical regeneration of NADH using conductive vanadia-silica xerogels", *Biotechnol. Prog.*, vol. 23 (2007) 293-296.

Slusarczyk, H., Felber, S., Kula, M., Pohl, M., "Stabilization of NAD-dependent formate dehydrogenase from *Candida boidinii* by site-directed mutagenesis of cysteine residues", *Eur. J. Biochem.*, vol. 267 (2000) 1280-1289.

Soares, C., Dos Santos, O., Olivo, J., Castro, H., Moraes, F., Zanin, G., "Influence of the alkyl-substituted silane precursor on sol-gel encapsulated lipase activity", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 29 (2004) 69-79.

Spagna, G., Andreani, F., Salatelli, E., Romagnoli, D., Pifferi, G., "Immobilization of α -L-arabinofuranosidase on chitin and chitosan", *Process Biochemistry*, vol. 33 (1998) 57-62.

Steckhan, E., "Electroenzymatic synthesis", *Top. Curr. Chem.*, vol. 170 (1994) 83-111.

Stephanson, C., Flanagan, G., "Non-toxic hydride energy source for biochemical and industrial venues: ORP and NAD⁺ reduction analyses", *International journal of hydrogen energy*, vol. 29 (2004) 459-464.

Suhadolnik, R., Lennon, M., Uematsu, T., Monahan, J., Baur, R., "Role of adenine ring and adenine ribose of nicotinamide adenine dinucleotide in binding and catalysis with alcohol, lactate, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases", *J. Biol. Chem.*, vol. 252, n°12 (1977) 4125-4133

Thomas, S.M., Dicosimo, R., Nagarajan, V., "Biocatalysis: applications and potentials for the chemical industry", *Trends in biotechnology*, vol. 20 (2002) 238-242.

Topcagic, S., Minteer, S., "Development of a membraneless ethanol/oxygen biofuel cell", *Electrochimica Acta*, vol. 51 (2006) 2168-2172.

Van der Donk, W., Zhao, H., "Recent developments in pyridine nucleotide regeneration", *Current opinion in biotechnology*, vol. 14 (2003) 421-426.

Veum, L., Hanefeld, U., "Enantioselective formation of mandelonitrile acetate: investigation of a dynamic kinetic resolution II", *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 15 (2004) 3707-3709.

Wagenknecht, P., Penney, J., Hembre, R., "Transition-metal-catalyzed regeneration of nicotinamide coenzymes with hydrogen", *Organometallics*, vol. 22 (2003) 1180-1182.

Wandrey, C., Reidel, D., Dordrecht, "Enzymes as catalysts in organic synthesis", Schneider, M. P. ed., (1986) 263-284.

Wang, J., "Sol-gel materials for electrochemical biosensors", *Analytica Chimica Acta*, vol. 399 (1999) 21-27.

Watanabe, T., Oka, O., Hoda, Y., Saheki, T., "Nicotine adenine dinucleotide synthesis by yeast", *Japanese patent 75160,484; 75 160,494* Chemical Abstracts 84, 178219a; 17822u (1975)

Weil J., "Biochimie générale", *Masson ed.* (1972)

Wichmann, R., Vasic-Racki, D., "Cofactor regeneration at the lab scale", *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol* vol. 92 (2005) 225-260.

Willner, I., Katz, E., Riklin, A., Kasher, R., "Mediated electron transfer in glutathione reductase organized in self-assembled monolayers on Au electrode", *Journal of American Chemical Society*, vol. 114 (1992) 10965-10966.

Wong, C., Whitesides, G., "Enzyme-catalysed organic synthesis: NAD(P)H cofactor regeneration by using glucose 6-phosphate and the glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*", *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 103 (1981) 4890-4899.

Wong, C., Whitesides, G., "Enzyme-catalyzed organic synthesis: regeneration of deuterated nicotinamide cofactors for use in large-scale enzymatic synthesis of deuterated substances", *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 105 (1983) 5012-5014

Yahiro, A., Lee, S., Kimble, D., "Bioelectrochemistry: I. Enzyme utilizing bio-fuel cell studies", *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 88 (1964) 375-383

Yalpani, M., Hall, L., "Some chemical and analytical aspects of polysaccharide modifications. 3. Formation of branched-chain, soluble chitosan derivatives", *Macromolecules*, vol. 17 (1984) 272-281.

Zhao, H., Van der Donk, W., "Regeneration of cofactors for use in biocatalysis", *Current opinion in biotechnology*, vol. 14 (2003) 583-589.

Chapitre II : L'enzyme *formate déshydrogénase* issue de *Candida Boidinii* : cinétique et immobilisation

SOMMAIRE

| | |
|--|----|
| I. Introduction..... | 74 |
| II. Etude liminaire : protocole d'analyse..... | 76 |
| 1) Quantification du cofacteur réduit NADH | 76 |
| 2) Quantification de l'enzyme <i>formate déshydrogénase</i> | 77 |
| III. Mécanismes et cinétique enzymatique..... | 79 |
| 1) Rappel de cinétique enzymatique..... | 79 |
| a) Cinétique à un substrat sans inhibition..... | 80 |
| b) Cinétique à deux substrats..... | 81 |
| i) Mécanisme bi-bi ordonné..... | 82 |
| ii) Mécanisme de Theorell-Chancelle..... | 83 |
| iii) Mécanisme ping pong..... | 84 |
| iv) Mécanisme aléatoire..... | 85 |
| 2) Détermination du mécanisme et des paramètres cinétiques associés à la <i>formate déshydrogénase</i> issue de <i>Candida Boidinii</i> | 85 |
| IV. Immobilisation de l'enzyme <i>formate déshydrogénase</i> | 90 |
| 1) Immobilisation par adsorption..... | 91 |
| a) Nettoyage et état de surface..... | 91 |

| | |
|---|-----|
| b) Adsorption de l'enzyme | 93 |
| c) Résultats et interprétations..... | 94 |
| 2) Immobilisation dans une matrice de Nafion® modifié..... | 96 |
| a) Préparation du Nafion® modifié..... | 98 |
| b) Immobilisation enzymatique dans le Nafion® modifié..... | 99 |
| c) Caractérisation..... | 99 |
| d) Résultats et interprétations..... | 100 |
| i) Inclusion homogène..... | 101 |
| ii) Inclusion couche par couche..... | 101 |
| 3) Immobilisation dans une matrice de chitosan modifié..... | 103 |
| a) Synthèse de l'alkylchitosan..... | 104 |
| i) Désacétylation du chitosan..... | 104 |
| ii) Addition des chaînes alkyl..... | 105 |
| b) Inclusion de l'enzyme..... | 105 |
| i) Choix du solvant de suspension..... | 106 |
| ii) Inclusion <i>via</i> une émulsion..... | 107 |
| iii) Inclusion couche par couche..... | 108 |

| | |
|--------------------|-----|
| V. Conclusion..... | 111 |
|--------------------|-----|

| | |
|-----------------|-----|
| Références..... | 112 |
|-----------------|-----|

I. Introduction

Le chapitre bibliographique a mis en avant la grande sensibilité physico chimique de l'enzyme *formate déshydrogénase*. En termes d'immobilisation, le peu de succès rencontré dans la littérature (faible activité, faible stabilité) témoigne de cet état de fait. Le protocole d'immobilisation doit donc employer des conditions expérimentales « douces » pour garantir un bon recouvrement de l'activité enzymatique. Ceci implique l'utilisation de températures modérées, de solvants compatibles et de réactifs non-inhibiteurs de l'enzyme. L'immobilisation par liaisons covalentes semble être celle répondant le moins bien à cette problématique d'après la littérature, et sera donc exclue. Dans ce chapitre, divers protocoles d'immobilisation, impliquant une adsorption ou une encapsulation de l'enzyme, seront éprouvés *via* un certain nombre de tests essentiellement qualitatifs. L'objectif est de proposer une ou plusieurs techniques d'immobilisation avant de traiter de leurs optimisations, ce qui constituera l'objet du chapitre suivant. Les critères de sélection principaux sont de deux ordres. D'une part, il s'agit de conserver au maximum l'activité initiale de l'enzyme après son immobilisation et lors de sa mise en œuvre, et d'autre part, de garantir une bonne rétention de la protéine sur le support, tout en permettant une diffusion rapide des réactifs et des produits. En effet, une non rétention d'une partie de l'enzyme et sa diffusion en solution est problématique à plusieurs égards, puisque le procédé perd en durée de vie et les produits de synthèse peuvent être pollués par le catalyseur. De plus, par essence, l'immobilisation enzymatique transforme une réaction en phase homogène en une réaction en phase hétérogène. Le transport par diffusion des réactifs vers

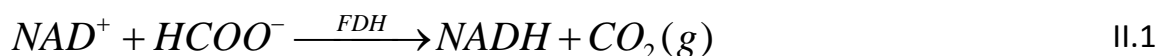
l'interface peut alors devenir un frein au bon avancement de la réaction. Il existe donc un compromis à trouver entre une matrice trop poreuse n'assurant pas la rétention du catalyseur et une immobilisation induisant une trop grande barrière diffusionnelle. Après un descriptif des techniques d'analyses et un bref rappel de cinétique enzymatique, trois techniques distinctes seront étudiées : l'adsorption sur l'or, l'inclusion dans différentes matrices de type Nafion® modifiées ou de type alkylchitosans.

II. Etude liminaire : protocole d'analyse

L'enzyme FDH (EC 1.2.1.2), issue de *Candida Boidinii* a été fournie par Sigma®. Son activité théorique annoncée par le fournisseur est de 1,2 U par mg de solide et de 9 U par mg de protéine et est cohérente avec l'expérience. Toutefois, des variations allant jusqu'à 20% d'activité sont courantes d'un lot à l'autre, c'est pourquoi celle-ci est vérifiée expérimentalement à chaque nouveau lot utilisé.

1) Quantification du cofacteur réduit NADH

L'équation II.1 illustre la réaction de régénération de NADH catalysée par l'enzyme *formate déshydrogénase* (Eq. II.1).



Le produit de la réaction II.1, NADH, peut être facilement quantifié par spectrophotométrie UV-vis. En effet, dans le milieu réactionnel impliqué (FDH, NAD^+ , NADH, $HCOO^-$, CO_2 , tampon phosphate), seule la forme réduite du cofacteur NADH absorbe à 340 nm. L'ensemble des analyses seront conduites dans une cuve UV en quartz, de 1 cm de trajet optique. Le spectre UV-vis de NADH, est présenté figure II.2. A partir de NADH commercial, en milieu tampon phosphate pH 7, il est possible de tracer une droite d'étalonnage à la longueur d'onde présentant le coefficient d'extinction molaire le plus important, soit 340 nm (encart figure II.1). Chaque valeur d'absorbance est une valeur moyenne issue de 10 mesures distinctes réalisées avec des solutions fraîchement préparées.

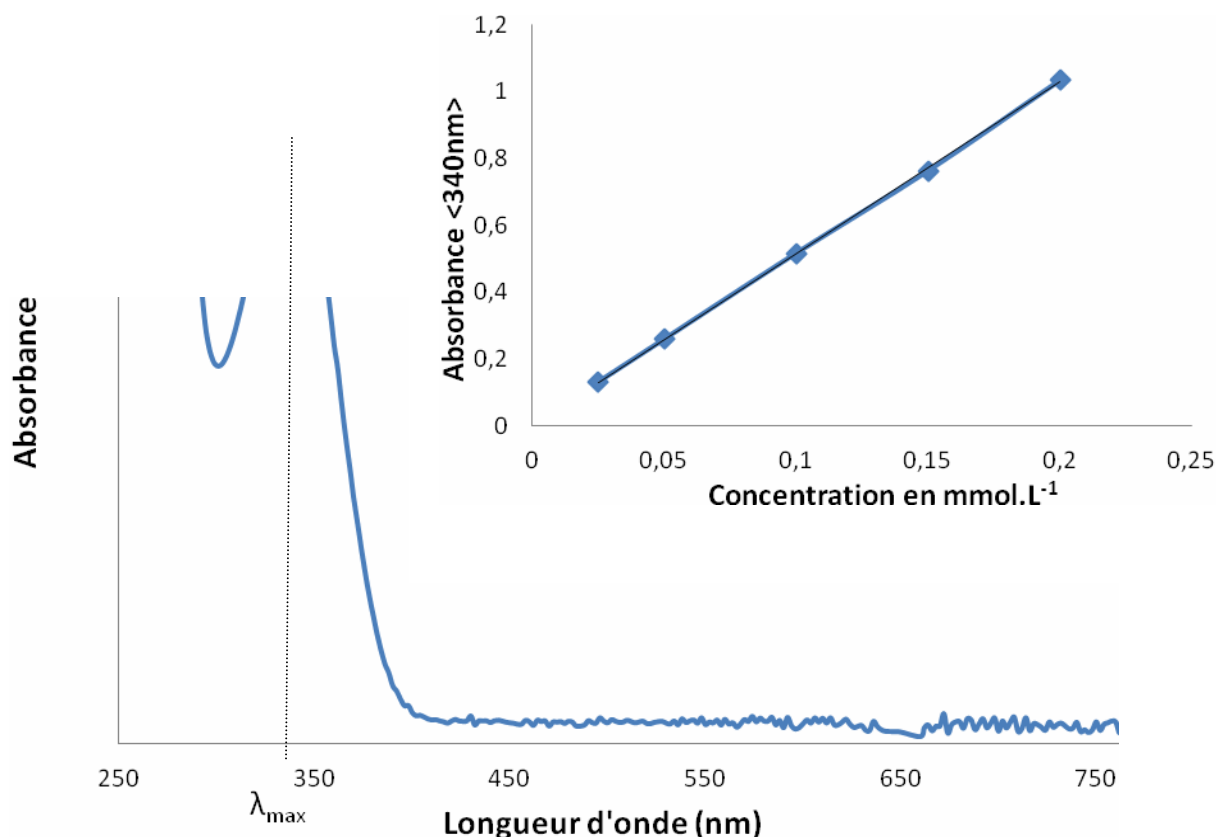


Figure II.1 : Spectre UV-vis de NADH en milieu tampon phosphate pH 7. Encart : Absorbance à 340 nm d'une solution de NADH commercial en milieu tampon phosphate en fonction de la concentration de NADH.

La pente de cette droite permet d'accéder à la valeur du coefficient d'extinction molaire de NADH à 340 nm : $\epsilon_{340 \text{ nm}} = 5164 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Dans la littérature, la valeur de $6220 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ est souvent avancée. Cependant le pH et la nature du tampon sont susceptibles de faire varier le degré de conjugaison de la molécule, et par conséquent, son coefficient d'extinction molaire.

2) Quantification de l'enzyme *formate déshydrogénase*

La cinétique de formation de NADH (Eq. II.1) renseigne notamment sur la quantité d'enzymes mise en jeu *via* l'activité spécifique. En effet, l'activité spécifique

(AS) d'une enzyme représente la quantité de substrat transformé par unité de temps et de masse d'enzyme, à une température donnée, et s'exprime généralement en $\mu\text{mol}.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$. Cette donnée est obtenue en cinétique initiale. La mesure de la vitesse initiale de réaction permet donc d'estimer la masse d'enzyme en solution grâce à l'équation II.2, à condition de connaître l'AS.

$$v = \frac{AS * m_{enzyme}}{V} \quad \text{II.2}$$

Où v représente la vitesse initiale de la réaction à 38°C, en $\mu\text{mol}.\text{L}^{-1}.\text{min}^{-1}$; AS l'activité spécifique de la formate déshydrogénase à 38°C, m_{enzyme} la masse d'enzyme en mg et V le volume de la solution en L.

La cinétique de formation de NADH peut être suivie par spectrophotométrie UV en enregistrant l'absorbance à 340 nm en continu pendant une minute. La pente à l'origine de la courbe $\text{Abs}_{340\text{nm}} = f(t)$ permet d'accéder à la valeur de la vitesse initiale. Expérimentalement, la réaction est déclenchée en mélangeant (50 % volumique) dans une cuve UV, la solution enzymatique dans du tampon phosphate à la solution de substrats, NAD^+ ($0,4 \text{ mmol}.\text{L}^{-1}$) et HCOO^- ($0,10 \text{ mol}.\text{L}^{-1}$) dans le même tampon. Les solutions ainsi que la cuve UV sont préalablement thermostatées à 38°C. Le mélange réactionnel doit être homogénéisé rapidement afin d'accéder aux valeurs de vitesses initiales. Un barreau magnétique ainsi qu'une agitation manuelle permettent le mélange des solutions en moins de 5 s. La détermination de la pente à l'origine se fait sur des temps allant de 5 à 8 s, période durant laquelle l'augmentation d'absorbance est inférieure à 15% de l'absorbance finale.

III. Mécanismes et cinétique enzymatique

1. Rappels de cinétique enzymatique

Cette partie s'attachera à faire un rapide rappel de cinétique enzymatique en décrivant les différents mécanismes connus ainsi que les lois de vitesses associées (Yon-Kahn, 2005). La première étude théorique qui constitue la base de la cinétique enzymatique est due à Michaelis et Menten en 1913. Leur modèle est basé sur l'existence d'un complexe ES, instable, entre l'enzyme, noté E, et le substrat, noté S. La théorie stipule, qu'après une courte période transitoire, la concentration en complexe ES atteint un état quasi-stationnaire (Eq. II.3) :

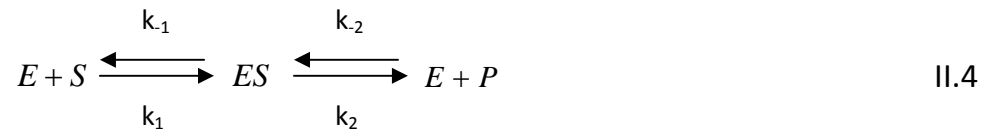
$$\frac{d(ES)}{dt} = 0 \quad \text{II.3}$$

La phase transitoire, qui permet d'atteindre ce quasi équilibre, ne dure qu'une fraction de seconde et n'est pas décelable dans des conditions classiques. De plus, compte tenu de la faible concentration de l'enzyme (10^{-10} à 10^{-6} mol.L⁻¹) devant les substrats (10^{-5} à 10^{-2} mol.L⁻¹), la théorie prévoit que la quantité de substrat transformé lors de la phase transitoire est négligeable. Au début de la phase stationnaire, la concentration en substrat est donc considérée égale à la concentration initiale et la concentration en produit est nulle. Toutes les concentrations et les vitesses exprimées dans le paragraphe sont donc égales aux valeurs initiales.

D'autres modèles prenant en compte des phénomènes complexes tels que l'inhibition par les substrats ou les produits ont depuis été développés mais aujourd'hui encore, les principaux mécanismes enzymatiques sont dit à comportement « Michaelien ».

a) Cinétique à un substrat sans inhibition

Ce cas considère le mécanisme le plus simple et peut être schématisé de la manière suivante (Eq. II.4):



E, S et P représentent respectivement l'enzyme libre, le substrat et le produit. k_1 , k_{-1} , k_2 et k_{-2} représentent les constantes de vitesse des différentes étapes.

La vitesse de formation du produit s'écrit donc:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] - k_{-2}[E][P] \quad \text{II.5}$$

En considérant l'état quasi-stationnaire du complexe ES (Eq. II.3), on en déduit :

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] + k_{-2}[E][P] - k_2[ES] = 0 \quad \text{II.6}$$

Cette relation, appliquée à l'état initial, (pour $[P]=0$), conduit à la constante de Michaelis du substrat, noté K_m :

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} = K_m \quad \text{II.7}$$

La constante de Michaelis K_m , homogène à une concentration, est un paramètre essentiel d'une réaction enzymatique donnée. En effet, plus la valeur de K_m est faible, plus le substrat a une grande affinité avec l'enzyme et plus la réaction est rapide.

D'après l'équation II.5, la vitesse initiale lorsque $[P]=0$, peut s'écrire $v=k_2[ES]$. La vitesse de réaction maximale, noté V_m , serait théoriquement atteinte lorsque la totalité de l'enzyme en solution est sous forme complexée, ES, donc $V_m=k_2[E]_{\text{tot}}$ avec $[E]_{\text{tot}}=[E]+[ES]$. En écrivant le rapport v/V_m , on obtient :

$$\frac{v}{V_m} = \frac{[ES]}{[E] + [ES]} \quad \text{II.8}$$

La combinaison des équations II.7 et II.8 donne la vitesse initiale de la réaction selon la loi de Michaelis Menten :

$$v = V_m \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad \text{II.9}$$

Il est à noter que lorsque $[S]=K_m$, la vitesse de la réaction est la moitié de la vitesse maximale théorique. La vitesse maximale V_m quant à elle, est directement proportionnelle à la quantité d'enzyme en solution.

La représentation de la linéarisation en double inverse ($1/v$ en fonction de $1/[S]$), appelée linéarisation de Lineweaver-Burk, est souvent utilisée pour vérifier la nature du mécanisme réactionnel et les valeurs des paramètres V_m et K_m .

b) Cinétique à deux substrats

Les enzymes employant des cofacteurs libres en solution, tel que NADH, pour transformer un substrat S_1 , obéissent à des cinétiques plus complexes. Dans ce cas, le cofacteur peut être considéré comme un second substrat S_2 à part entière, au même titre, par exemple, que le formate pour une *formate déshydrogénase*. Les principaux mécanismes à deux substrats sont les suivants :

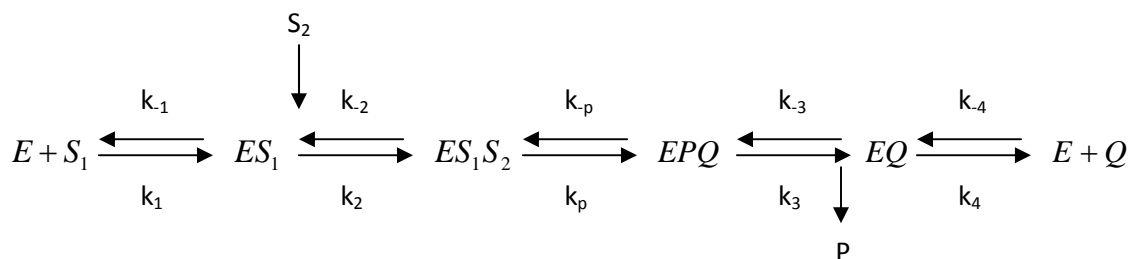
- ✓ -bi-bi ordonné
- ✓ -Theorell-Chance
- ✓ -ping-pong
- ✓ -aléatoire

La démarche pour modéliser ces mécanismes reste la même et consiste à considérer les associations possibles de l'enzyme avec les substrats et les réactions parallèles permettant de passer d'une association à l'autre. Les deux produits, notés P et Q sont issus respectivement des deux substrats S_1 et S_2 .

Par souci de concision, les différents développements mathématiques (Yon-Kahn, 2005) seront passés sous silence et seul le mécanisme et l'équation de vitesse établie seront présentés. Les schémas des mécanismes seront représentés par la nomenclature de Cleland.

i) Mécanisme bi-bi ordonné

Le mécanisme bi-bi ordonné peut être schématisé comme suit :



Ce mécanisme suppose que l'enzyme ne puisse se lier qu'au substrat S_1 , et que S_2 ne puisse se lier qu'au complexe ES_1 ainsi formé. Le complexe ES_1S_2 réagit alors pour former le complexe EPQ , entraînant la libération séquentielle des produits, P puis Q.

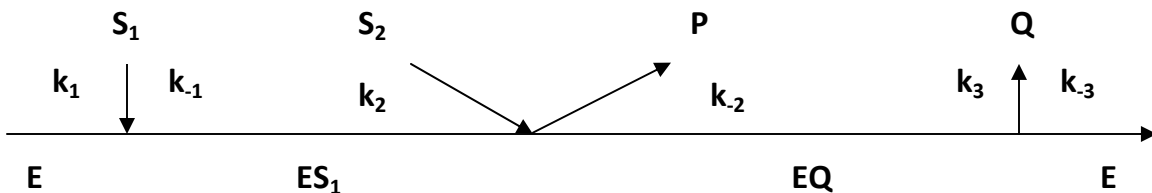
La loi de vitesse en cinétique initiale ($[P]=0$ et $[Q]=0$) s'écrit :

$$\frac{v}{V_m} = \frac{[S_1][S_2]}{K_{ia}K_{m2} + K_{m2}[S_1] + K_{m1}[S_2] + [S_1][S_2]} \quad \text{II.10}$$

avec $K_{ia}=k_{-1}/k_1$ la constante de dissociation du complexe ES_1 , et K_{m1} , K_{m2} les constantes de Michaelis des substrats S_1 et S_2 .

ii) Mécanisme de Theorell-Chance

Le mécanisme Theorell-Chance peut être schématisé comme suit :

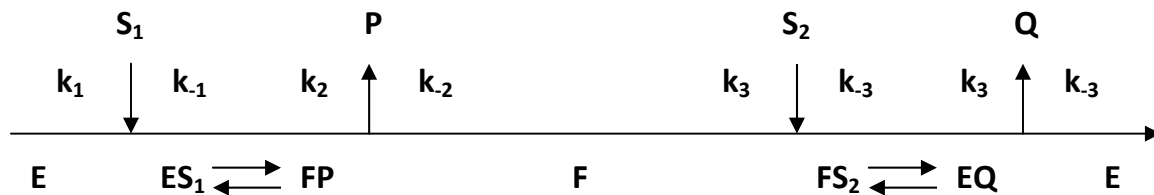


Ce mécanisme, très proche du bi-bi ordonné, suppose que le complexe ternaire ES_1S_2 n'existe pas et que S_2 est directement transformé en P au contact du complexe binaire ES_1 . Celui-ci réagit alors pour former un complexe EQ, avant de libérer Q et l'enzyme E.

En pratique, ces mécanismes sont proches et conduisent à une loi de cinétique initiale similaire à celle décrite par l'équation II.10.

iii) Mécanisme ping-pong

Dans ce mécanisme, schématisé ci-dessous, l'enzyme oscille entre deux formes distinctes notées E et F.



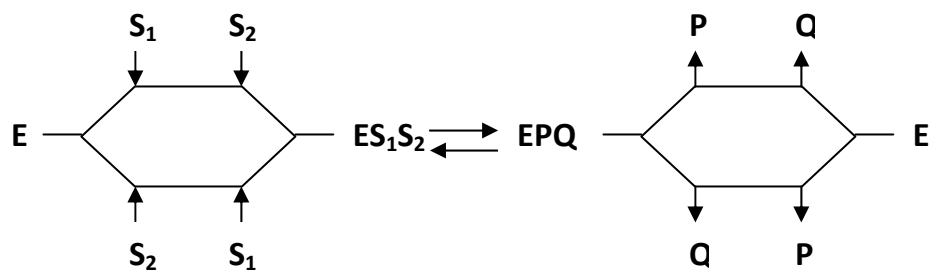
L'enzyme, au contact du premier substrat S_1 , forme un complexe ES_1 qui réagit pour former un complexe FP . Celui-ci libère le produit P , et la forme alternative F de l'enzyme, réagit à son tour avec le substrat S_2 pour former FS_2 . FS_2 se transforme alors pour former EQ qui libère le produit Q et l'enzyme initiale E .

La loi de vitesse en cinétique initiale ($[P]=0$ et $[Q]=0$) s'écrit :

$$\frac{v}{V_m} = \frac{[S_1][S_2]}{K_{m2}[S_1] + K_{m1}[S_2] + [S_1][S_2]} \quad \text{II.11}$$

iv) Mécanisme aléatoire

Ce mécanisme considère l'absence d'ordre prioritaire lors de la fixation des substrats sur l'enzyme et lors de la libération des produits ; toutes les combinaisons sont à considérer.

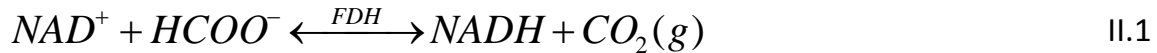


Ce mécanisme conduit à une équation de vitesse initiale complexe (plus de 37 termes au dénominateur), non linéarisable et qui s'écarte d'un comportement Michaelien classique. Cependant, dans un certain nombre de cas, l'étape limitante est la transformation du complexe ES_1S_2 en EPQ . Dans ce cas, l'équation de la loi de vitesse du mécanisme bi-bi ordonné (Eq. II.10) décrit correctement le système.

2. Détermination du mécanisme et des paramètres cinétiques associés à la *formate déshydrogénase* issue de *Candida Boidinii*

Une même enzyme peut catalyser une réaction selon différents mécanismes en fonction de la souche de levure ou de bactérie dont elle est issue. L'enzyme *formate*

déshydrogénase issue de *Candida Boidinii* a déjà été étudiée par Kato *et al.* en 1979. Les auteurs proposent un mécanisme bi-bi ordonné pour la réaction suivante :



Le 1^{er} substrat à se lier à l'enzyme est le cofacteur NAD^+ (S_1) et le dernier produit de réaction est $NADH$ (Q). L'objectif de ce paragraphe est de vérifier expérimentalement ce mécanisme et de déterminer les paramètres cinétiques associés à cette réaction. La mesure des vitesses initiales de réaction (cf paragraphe II.2) pour différentes concentrations en NAD^+ (S_1) est réalisée en maintenant constante la concentration en formate (S_2), pour trois concentrations distinctes de ce dernier. Les valeurs des trois concentrations $[S_2]$ sont choisies suffisamment faibles pour induire de fortes variations de vitesse de réaction lorsque $[S_1]$ varie.

La loi de vitesse d'un mécanisme bi-bi ordonné, décrit par l'équation II.10, peut être linéarisée en double inverse par la méthode de Lineweaver-Burk ($1/v=f(1/[S_1])$) afin d'accéder aux valeurs des paramètres cinétiques.

$$\frac{1}{v} = \left(\frac{K_{ia} \cdot K_{m2}}{V_m \cdot [S_2]} + \frac{K_{m1}}{V_m} \right) \cdot \frac{1}{[S_1]} + \frac{K_{m2}}{[S_2] \cdot [V_m]} + \frac{1}{V_m} \quad II.12$$

Une courbe typique indiquant l'évolution de la concentration en NADH formé en fonction du temps est représentée à la figure II.2. La double flèche indique l'intervalle de temps utilisé pour calculer la vitesse de réaction initiale.

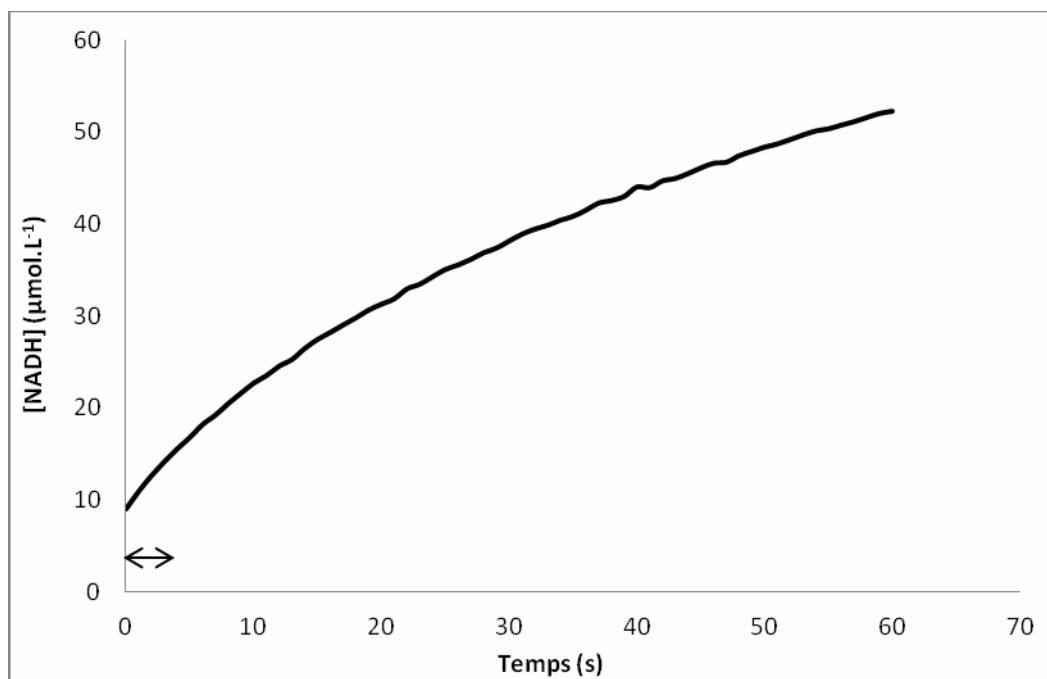


Figure II.2 : Evolution de la concentration en NADH formé au cours du temps. $[NAD^+]^0 = 0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$;
 $[HCOO^-]^0 = 12,5 \text{ mmol.L}^{-1}$; $[FDH] = 0,792 \text{ U.mL}^{-1}$, $T = 38^\circ\text{C}$, pas 0,9 s.

La représentation de la linéarisation de Linweaver-Burk permet d'une part, de confirmer la nature du mécanisme retenu *via* la linéarité elle-même, et les paramètres peuvent être déduits des points particuliers indiqués sur la figure II.3.

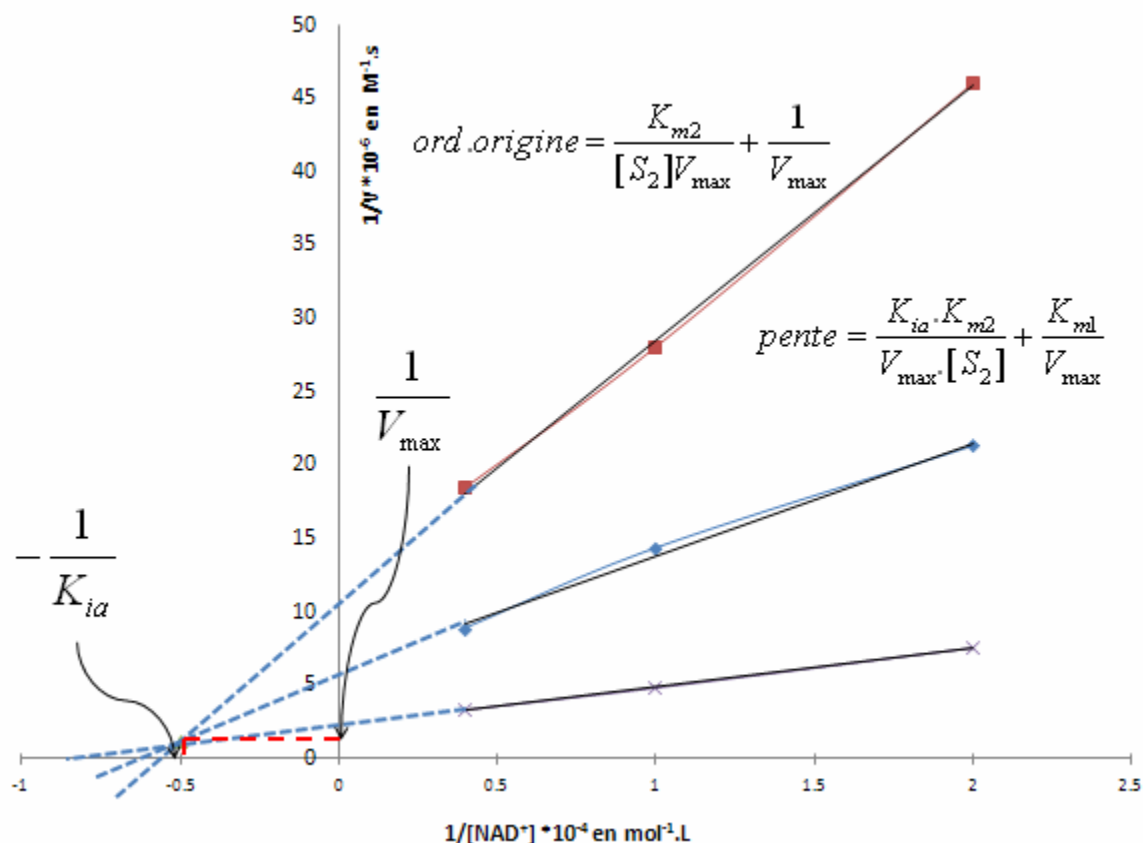


Figure II.3 : Evolution de l'inverse de la vitesse initiale en fonction de l'inverse de la concentration en NAD^+ (méthode de Lineweaver-Burk). Résultats d'une campagne expérimentale de mesure des vitesses initiales réalisée dans différentes conditions de concentration en formate et interprétés par un mécanisme bi-bi ordonné. Formate : ■ $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$; ◆ $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$; × $12,5 \text{ mmol.L}^{-1}$. $[\text{FDH}] = 0.79 \text{ U.mL}^{-1}$. $T = 38^\circ\text{C}$.

La linéarité obtenue pour les 3 concentrations en formate et le fait que les 3 courbes se recoupent en un seul point confirme la nature du mécanisme bi-bi ordonné. Les valeurs des différents paramètres cinétiques obtenus grâce aux points particuliers indiqués sur la figure II.3 sont consignées dans le tableau II.4.

| V_m (mol.L ⁻¹ .s ⁻¹) | K_{ia} (mol.L ⁻¹) | $K_m(NAD^+)$ (mol.L ⁻¹) | $K_m(formate)$ (mol.L ⁻¹) |
|---|---------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| $8,8.10^{-6}$ | $2,0.10^{-4}$ | $8,2.10^{-5}$ | $9,2.10^{-3}$ |

Tableau II.4 : Valeurs expérimentales de V_{max} ($0,79 \text{ U.mL}^{-1}$), de la constante de dissociation et des constantes de Michaelis issues des résultats de la figure II.3.

Les valeurs des constantes de Michaelis sont du même ordre que celles de la littérature. En effet, Mesentsev et al. (1997) avancent une valeur de $15,10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ pour le formate et de $11,10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ pour NAD^+ . Les valeurs de ces constantes, obtenues expérimentalement, seront utilisées ultérieurement au chapitre IV, lors des simulations théoriques.

IV. Immobilisation de l'enzyme *formate déshydrogénase*

Les techniques d'immobilisation enzymatique peuvent être classées selon trois familles distinctes, en fonction des interactions responsables de la rétention du catalyseur. Dans le cas de la *formate déshydrogénase*, la littérature montre que l'immobilisation par liaisons covalentes est, *a priori*, la moins adaptée et sera exclue. Les principes de ces techniques sont schématisés à la figure II.5.

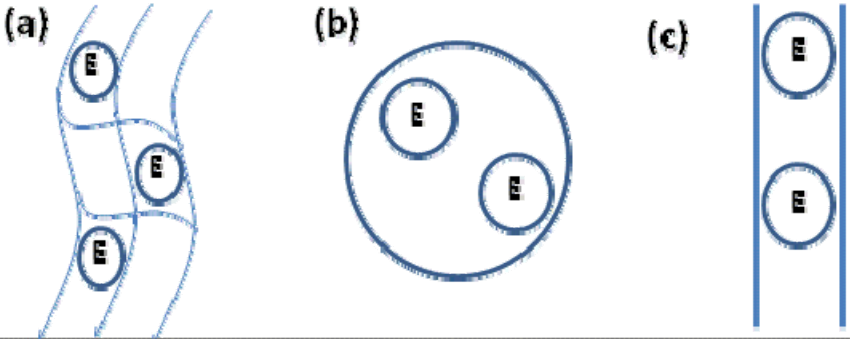
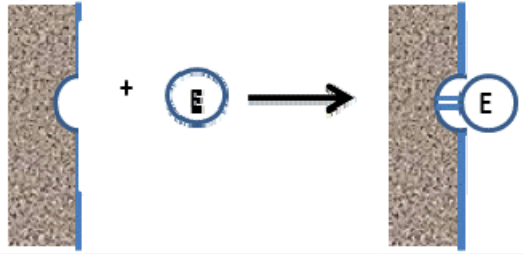
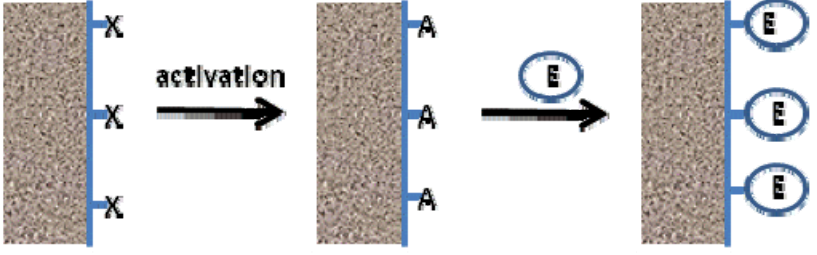
| Méthode | Principe |
|--|--|
| Inclusion (a) Gel, polymère (b) Microcapsule (c) Fibre |  |
| Adsorption |  |
| Liaison Covalente |  |

Figure II.5 : Tableau représentant les principes des différents types de confinement d'enzymes

1) Immobilisation par adsorption

L'objectif de cette partie est de déterminer si une adsorption sur un support en or est susceptible d'immobiliser efficacement l'enzyme *formate déshydrogénase*. En effet, il est possible de retenir spontanément une protéine par simple trempage d'une surface métallique, généralement en or, dans une solution d'enzymes (Parra, 2007). L'état de surface est un paramètre essentiel qui régit les interactions entre l'enzyme et le support. Les techniques électrochimiques, entre autres, sont adaptées pour étudier et contrôler l'état de surface de l'or. Ces différents états seront testés vis-à-vis de la rétention enzymatique de la FDH, de son activité résultante et de sa durée de vie.

a) Nettoyage et état de surface

L'ensemble des travaux a été réalisé dans un microréacteur composé de deux électrodes planes en or et en platine, d'une surface géométrique de 17,5 cm² chacune, montées dans une structure filtre presse. L'anode et la cathode comportent respectivement 130 microcanaux de réaction de 160 µm de diamètre et sont séparées par une membrane échangeuse de protons en Nafion® N1135 1100 EW de 89 µm d'épaisseur. Un fil de platine, inséré dans le compartiment de l'or, est utilisé comme pseudo électrode de référence (électrode de comparaison), tandis que l'or est l'électrode de travail et le platine la contre électrode. Le réacteur est thermostaté. Les solutions circulent à l'aide d'une pompe peristaltique. Le nettoyage électrochimique et les voltampérogrammes cycliques ont été réalisés avec un potentiostat AUTOLAB 30. Le microréacteur sera décrit en détails au Chapitre III, paragraphe II.

Préalablement à chaque expérience, l'électrode d'or est traitée afin de désorber les espèces présentes sur sa surface, et particulièrement les enzymes ou les

fragments de protéines restants. Pour ce faire, l'électrode d'or est soumise à des polarisations cycliques dans une solution d'acide sulfurique à $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ circulant à $0,8 \text{ mL.min}^{-1}$. Les bornes de potentiels sont fixées à $-0,8 \text{ V}_{\text{réf}}$ dans le domaine cathodique et $1,2 \text{ V}_{\text{réf}}$ dans le domaine anodique, ce qui correspond respectivement au début de la réduction et de l'oxydation du solvant. Le balayage des potentiels est maintenu pendant environ 2h à 100 mV.s^{-1} , soit 360 cycles complets. Ce nettoyage est réalisé à 60°C afin de favoriser la désorption. Un cycle typique, obtenu en fin de nettoyage, lorsque la reproductibilité est totale, est présenté figure II.6.

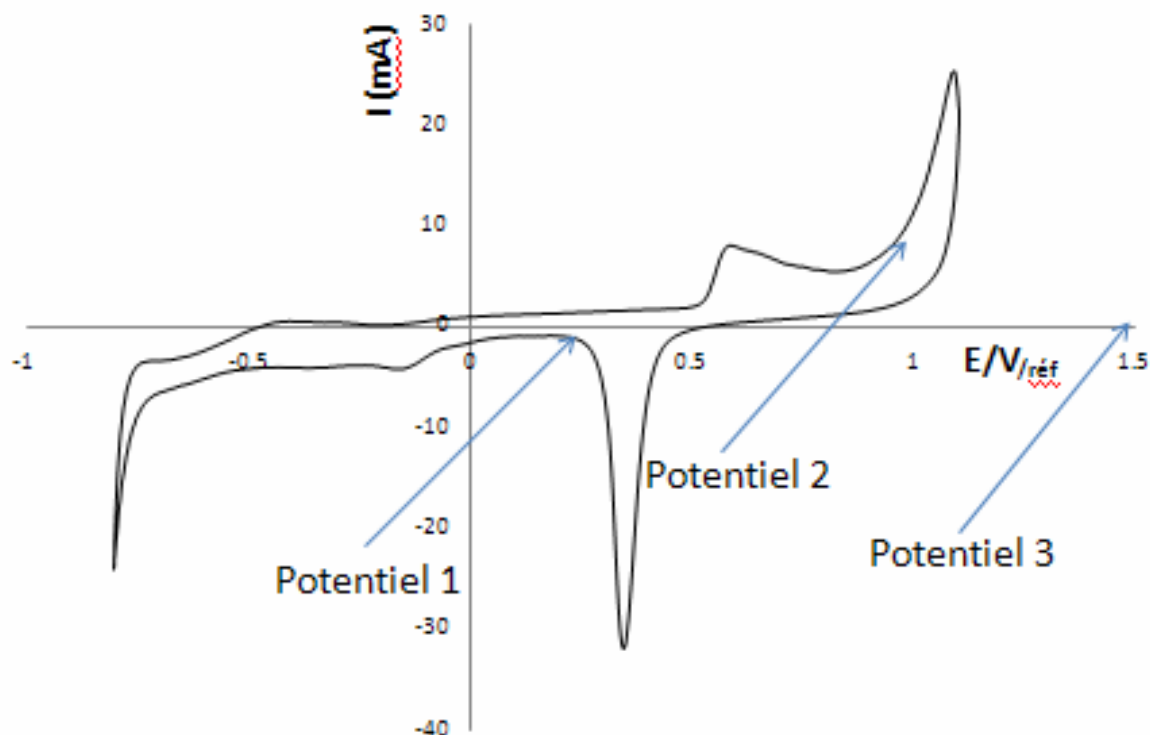


Figure II.6 : Voltampérogramme cyclique obtenu en fin de nettoyage de l'électrode d'or ($S=17,5 \text{ cm}^2$) à l'aide d'une solution d'acide sulfurique à $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ circulant à $0,8 \text{ mL.min}^{-1}$; $r=100 \text{ mV.s}^{-1}$; $T=60^\circ\text{C}$.

Electrode de comparaison : fil de platine, contre électrode en platine.

Deux degrés d'oxydation de l'or peuvent être distingués sur cette courbe. Le pic cathodique à $+0,4V_{/réf}$ correspond à la réduction des oxydes d'or en surface de l'électrode (Angerstein-Kozłowska, 1987). Le pic anodique à $+0,6V_{/réf}$ présente un épaulement attribué au transfert des deux électrons nécessaires à la formation de l'oxyde d'or (Balasubramanian, 2006). La valence, mixte, de l'oxyde d'or résultant est un sujet encore étudié de nos jours.

Afin de contrôler l'état de surface final de l'or, avant de passer à l'adsorption elle-même, le cycle est arrêté à différents potentiels. Au potentiel noté 1 sur le voltamperogramme ($+0,25 V_{/réf}$), l'or est sous forme métallique. Au potentiel 2 ($+0,98 V_{/réf}$), l'or superficiel est oxydé. Enfin, au potentiel 3 ($+1,4V_{/réf}$) l'or est également oxydé mais un éventuel changement du degré d'oxydation de l'or pourrait être masqué par le front du solvant. A ces trois potentiels, soit le cycle est directement arrêté, soit le potentiel est maintenu pendant 5 min avant arrêt. Chaque état de surface résultant est soumis à adsorption avant caractérisation.

b) Adsorption de l'enzyme

Après avoir conditionné la surface d'or, l'adsorption de l'enzyme peut avoir lieu. Le réacteur est d'abord rincé en faisant circuler de l'eau ultrapure dans les deux compartiments pendant 1h afin d'éliminer toute trace d'acide sulfurique. En effet, l'enzyme doit être conditionnée dans un tampon phosphate pH 7 pour augmenter sa stabilité. Une solution de tampon phosphate est alors mise en circulation dans les deux compartiments et le réacteur est thermostaté à 4°C pour favoriser l'adsorption. Une fois l'équilibre thermique atteint, le tampon phosphate dans le compartiment de l'or est remplacé par 10 mL de solution d'enzyme *formate déshydrogénase* à 1 g.L^{-1} dans ce même tampon pH. La solution circule en recyclage continu à faible débit ($0,4 \text{ mL.min}^{-1}$)

pendant 3h. Le réacteur est alors rincé avec 20 mL de tampon phosphate à 4°C et 0,4 mL.min⁻¹ pour évacuer l'enzyme peu ou pas adsorbée sur l'électrode.

La quantité d'enzyme immobilisée peut alors être caractérisée. Le réacteur est thermostaté à 38°C, ce qui correspond à la température de fonctionnement optimum de l'enzyme. Une solution de tampon phosphate contenant 0,2 mmol.L⁻¹ de NAD⁺ et 0,05 mol.L⁻¹ de formate HCOO⁻ circule dans le compartiment de l'or, tandis que du tampon phosphate seul est utilisé côté platine. Le débit de référence utilisé pour comparer les différentes expériences est de 0,4 mL.min⁻¹. En sortie du réacteur, la solution est collectée dans un pilulier, changé toutes les 10 min, pendant 2h. Immédiatement après avoir récupéré un échantillon, celui-ci est analysé par spectrophotométrie UV à 340 nm et la conversion de NAD⁺ en NADH est déduite. Toutes choses égales par ailleurs, (concentrations, température, débit...) la conversion permet de comparer qualitativement entre les différentes expériences, l'efficacité de l'immobilisation en termes de quantité et d'activité enzymatique.

c) Résultats et interprétations

Pour l'ensemble des essais d'adsorption de FDH sur l'électrode microstructurée, une absorbance à 340 nm de la solution en sortie est observée. Ceci traduit bien la formation de NADH et donc la présence d'enzyme *formate déshydrogénase* adsorbée. Cependant, les durées de vie sont faibles et au bout de 2 à 3h selon l'expérience, la conversion de NAD⁺ en NADH devient nulle, traduisant une désorption ou une désactivation de l'enzyme. Les résultats obtenus en terme de conversion ($[NADH]/[NAD^+]^0$), mesurés en début de réaction, après mise en régime du réacteur sont consignés tableau II.7.

| Préparation de la surface d'or | $E_1=0,25 \text{ V}_{\text{réf}}$ | $E_2=0,98 \text{ V}_{\text{réf}}$ | $E_3=1,4 \text{ V}_{\text{réf}}$ |
|--------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| Arrêt du cycle au potentiel | 7,7% | 11,6% | 12,6% |
| Maintien du potentiel | 9,7% | 5,8% | 7,8% |

Figure II.7: Conversion de NAD^+ en NADH en sortie du réacteur selon l'état de surface de l'or avant l'adsorption de la formate déshydrogénase. Concentrations initiales dans le tampon phosphate pH 7 : $[\text{HCOO}^-]=0,05 \text{ mol.L}^{-1}$, $[\text{NAD}^+]=0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$, $T=38^\circ\text{C}$, débit $0,4 \text{ mL.min}^{-1}$.

Quel que soit le conditionnement de la surface d'or, les conversions restent faibles (<13%). Lorsque le potentiel est maintenu à $E_2=0,98 \text{ V}_{\text{réf}}$ ou à $E_3=1,4 \text{ V}_{\text{réf}}$ pendant 5 min avant arrêt, l'immobilisation semble moins efficace. L'hypothèse émise est que l'oxygène dégagé à ces potentiels par l'oxydation de l'eau est susceptible de s'adsorber en partie sur l'électrode, occupant un certain nombre de sites d'adsorption, rendues indisponibles pour l'enzyme. Cependant, il semble difficile de discerner des tendances claires, les conversions étant toutes du même ordre de grandeur.

Il semble également nécessaire de vérifier si une partie de la tuyauterie en PTFE, tel que les tubes d'entrée et de sortie des fluides, ne sont pas susceptibles d'adsorber une partie de l'enzyme, faussant ainsi les mesures. Pour ce faire, un tube en PTFE d'une longueur égale à l'ensemble de la tuyauterie du microréacteur est conditionné selon le même protocole que précédemment. Le tube et le réservoir sont thermostatés à 4°C avant de faire circuler 10 mL de solution d'enzyme *formate déshydrogénase* à 1 g.L^{-1} en recyclage pendant 3h. La réaction II.1 est mise en œuvre dans les mêmes conditions ($[\text{HCOO}^-]=0,05 \text{ mol.L}^{-1}$, $[\text{NAD}^+]=0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$, $T=38^\circ\text{C}$, débit $0,4 \text{ mL.min}^{-1}$) afin de vérifier, la présence ou non d'enzymes. L'expérience est réalisée trois fois et donne une conversion moyenne de 3,40%.

Les résultats précédents sont donc à nuancer. En effet, selon les expériences, entre 27 et 58% de l'activité enzymatique observée est dû, non pas à de l'enzyme immobilisée sur le support en or, mais à de l'enzyme adsorbée sur la tuyauterie.

L'immobilisation de l'enzyme *formate déshydrogénase* par simple adsorption sur or ne peut donc pas être envisagée pour conduire un procédé enzymatique de synthèse. En effet, l'activité enzymatique résultante est faible dès le début de réaction, que ce soit dû à une faible quantité d'enzyme immobilisée ou à une importante désactivation. De plus, la durée de vie du support fonctionnalisé, de l'ordre de quelques heures, est trop courte pour envisager un procédé de régénération de NADH. Celle-ci est soit relarguée par le support, soit désactivée au cours de la réaction.

2) Immobilisation dans une matrice de Nafion® modifiée

Le Nafion® est un polymère utilisé, entre autres, pour former des membranes échangeuses de protons pour le développement de piles à combustible. Par extension, son emploi s'est également développé dans le domaine de l'électrochimie en tant que membrane de cellule d'électrolyse. La formule développée du Nafion® est indiquée sur la figure II.8.

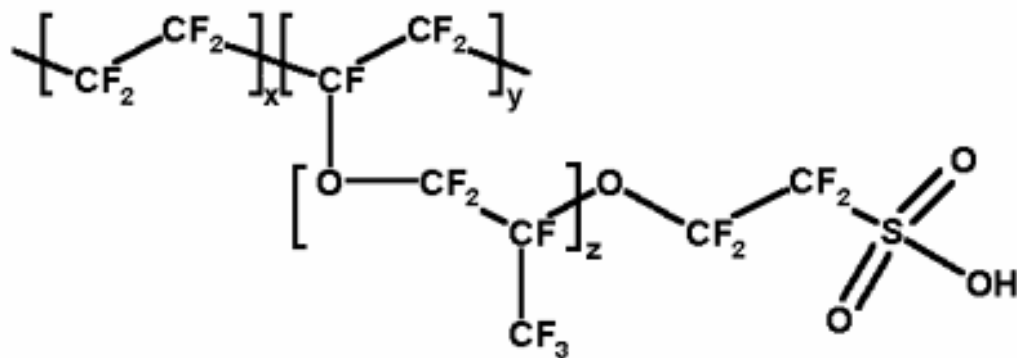
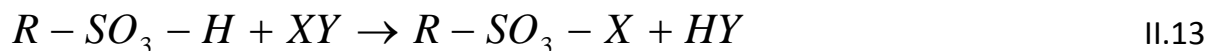


Figure II.8 : Formule développée du Nafion®

Les valeurs de x , y et z peuvent être variables. Pour classer les différentes formes du polymère, une grandeur noté EW (Equivalent weight) est utilisé. Elle correspond au poids moyen de membrane contenant l'équivalent d'une mole de groupement échangeur d'ions, ici la fonction acide sulfonique $-SO_3H$. Le proton labile de cette fonction est responsable du caractère échangeur d'ions de ce polymère. Sa nature acide cependant, a longtemps limité son emploi comme matrice d'immobilisation enzymatique. Ces dernières années, l'équipe du Professeur Minteer a tenté d'améliorer cette faible biocompatibilité d'une part, et d'augmenter le transport de matière à travers la matrice d'autre part, en remplaçant ce proton par différents cations. Ce principe peut être résumé par la réaction II.13 :



Où X représente un cation présentant une plus grande affinité vis-à-vis de la fonction sulfonate $-SO_3^-$ que le proton. Le Nafion® modifié obtenu présente une meilleure biocompatibilité grâce à la baisse d'acidité, et le transfert de matière peut être amélioré *via* le changement de la structure poreuse induit par certains cations. L'équipe

du Professeur Minter a ainsi testé plusieurs sels distincts et étudié les propriétés du polymère obtenu. Ces sels peuvent être classés en deux grandes familles.

- ✓ Les sels d'ammonium (Moore et Akers, 2004 ; Klotzbach, 2006) :
 - Bromure d'ammonium (A)
 - Chlorure de tetraméthylammonium (TMA)
 - Bromure de tetraéthylammonium (TEA)
 - Bromure de tetrabutylammonium (TBA)
- ✓ Les sels de phosphonium (Moore et Hackman, 2005)
 - Bromure de tetraethylphosphonium (TEP)
 - Bromure de tetrabutylphosphonium (TBP)
 - Bromure de tetraphenylphosphonium (TPP)

Cette méthode de modification de la matrice Nafion® sera mise en œuvre pour étudier l'immobilisation de l'enzyme FDH.

a) Préparation du Nafion® modifié

Le Nafion® EW 1100 a été fourni par Sigma-Aldrich® sous forme de suspension à 10 % massique dans l'eau. Les différents sels d'ammonium et de phosphonium testés, (fournis également par Sigma-Aldrich®), sont les suivants : A, TMA, TEA, TBA, TPP. La réaction II.13 est conduite en dissolvant chacun des sels dans la suspension de Nafion® à 10% massique dans l'eau. La concentration en sel est fixée à trois fois la concentration en fonction acide sulfonique de la suspension, déterminée à l'aide du EW. Les auteurs (Moore, Akers, 2004 et Klotzbach, 2006) indiquent en effet qu'il s'agit de la concentration optimale permettant d'obtenir une membrane stable et reproductible. Avant l'incorporation de l'enzyme, l'excès de sels et les protons issus du Nafion® doivent être extraits de la suspension pour ne pas désactiver la protéine. Pour

cela, la suspension est déposée et le solvant est évaporé. La membrane ainsi obtenue est immergée dans de l'eau ultrapure pendant 24h. Le surnageant est évacué, la membrane est rincée puis séché sous vide. Le Nafion® modifié est remis en suspension à 10 % massique dans le méthanol.

b) Immobilisation enzymatique dans le Nafion® modifié

Deux techniques distinctes vont être testées pour incorporer l'enzyme *formate déshydrogénase* dans les différents Nafion® modifiés : une inclusion homogène de FDH dans le volume de la matrice et une couche par couche. Les dépôts sont réalisés sur une plaque d'or de 65 mm² afin de faciliter leur caractérisation en introduisant directement le support modifié dans la cuve de spectrophotométrie UV. La plaque d'or est préalablement nettoyée à l'éthanol et à l'acétone puis séchée.

Pour l'inclusion homogène, une suspension de Nafion® modifié à 10% massique est mélangée (33% volumique) à une solution de tampon phosphate contenant l'enzyme *formate déshydrogénase* à 1 g.L⁻¹. Après homogénéisation, 100 µL.cm⁻² de suspension sont déposés sur la plaque support. Les solvants sont évaporés (à l'air libre puis sous vide pour ôter les traces de solvants).

Pour l'inclusion couche par couche, un premier dépôt (30 µL.cm⁻²) de la solution d'enzyme à 1 g.L⁻¹ dans un tampon phosphate est réalisé puis séché sur la plaque support. Dans un second temps, 60 µL.cm⁻² de suspension de Nafion® sont répartis sur la couche d'enzyme préalablement déposée et mis à sécher à l'air libre. La plaque est alors passée au dessiccateur sous vide.

c) Caractérisation

Les plaques supports d'or employant les différents Nafion® modifiés et les deux techniques d'inclusion sont maintenant prêtes à être caractérisée en termes de rétention et d'activité enzymatique. Le relargage, qui représente le passage d'enzyme peu ou pas immobilisée de la matrice vers la solution, doit être caractérisé avant de mesurer l'activité catalytique du dépôt.

Pour ce faire, préalablement à toute mesure de l'activité enzymatique, chaque dépôt est immergé dans 2 mL de tampon phosphate pH 7 pendant 1h. Le surnageant est ensuite récupéré et la quantité d'enzyme présente est caractérisée suivant le protocole indiqué paragraphe II.2.

Le dépôt présent sur la plaque support peut ensuite être caractérisé, toujours par spectrophotométrie UV. Pour cela, la plaque d'or est déposée directement au fond de la cuve UV et celle-ci est remplie de solution de tampon phosphate contenant 0,2 mmol.L⁻¹ de NAD⁺ et 0,05 mol.L⁻¹ de formate HCOO⁻. L'absorbance à 340 nm est ensuite mesurée toutes les 5 s pendant 1h.

d) Résultats et interprétations

L'extraction des sels en excès après la modification du Nafion® est une étape critique pour obtenir une membrane stable mécaniquement. En effet, les membranes formées après une extraction insuffisante se délitent quasi instantanément au contact de la solution aqueuse que constitue le milieu réactionnel. Cette extraction est donc délicate du point de vue expérimental, le dépôt chargé de sels étant très fragile mécaniquement. Après optimisation, le protocole retenu consiste à laver un dépôt issu de 2 mL de suspension de Nafion® modifié à 10 % massique avec de l'eau ultrapure pendant 24h. Le surnageant est retiré puis le dépôt est rincé.

Malgré ces précautions, sur les cinq sels testés (A, TMA, TEA, TBA, TPP), deux n'ont pas conduit à des membranes stables mécaniquement, il s'agit du bromure d'ammonium (A) et du bromure de tetrabutylammonium (TBA). Ces deux sels seront donc exclus de la suite des travaux.

i) Inclusion homogène

Les résultats des tests catalytiques pour le surnageant d'une part, et pour le dépôt d'autre part, sont sans équivoque, l'enzyme *formate déshydrogénase* est entièrement désactivée par le protocole d'immobilisation. En effet, l'absorbance à 340 nm reste nulle pendant l'heure de mesure, que ce soit avec le surnageant ou avec la plaque support. L'hypothèse émise pour expliquer ce phénomène est que l'enzyme est désactivée par sa dissolution dans la suspension de Nafion® modifié qui contient 33% d'éthanol. Le protocole d'immobilisation issu des travaux de l'équipe du Professeur Minter (Moore, Akers, 2004 ; Klotzbach, 2006 ; Moore, Hackman, 2005) indique l'emploi d'éthanol ou de méthanol pour suspendre le Nafion® modifié avant d'ajouter la solution aqueuse d'enzymes dans les mêmes proportions volumiques. Le méthanol a donc été testé en remplacement de l'éthanol mais les résultats restent identiques. Après contact avec le Professeur Minter et comparaison de nos protocoles, aucune hypothèse n'a pu être émise pour expliquer ces résultats. Inclure l'enzyme couche par couche en limitant sa mise en contact avec le solvant de suspension au strict minimum sera donc testé.

ii) Inclusion couche par couche

L'inclusion couche par couche permet de minimiser le temps de contact entre l'enzyme et l'éthanol à quelques secondes, le temps d'évaporer le solvant sous hotte. L'enzyme est alors préservée, du moins partiellement. En effet, la présence

d'enzyme FDH active dans le surnageant issue du relargage a été démontré. Les membranes obtenues, cependant, sont très peu stables mécaniquement. Lors de l'extraction du surnageant, le dépôt se délite conduisant à un relargage complet de l'enzyme en solution, et ce quelque soit le sel utilisé. En effet, l'enzyme étant soluble dans l'eau, elle constitue une très mauvaise couche d'accroche pour la membrane, elle même poreuse à l'eau.

En conclusion, le Nafion® modifié par différents sels n'a pas permis d'immobiliser la formate déshydrogénase avec succès. L'inclusion homogène conduit à une désactivation prématurée de l'enzyme. Ceci est attribué à l'incompatibilité chimique entre le solvant de suspension du polymère et le catalyseur. L'inclusion couche par couche, quant à elle, induit des membranes extrêmement fragiles mécaniquement, ce qui conduit à un passage total de l'enzyme en solution. Des études supplémentaires permettraient peut être de trouver un solvant alternatif, non inhibiteur de la *formate déshydrogénase*.

3) Immobilisation dans une matrice de Chitosan modifié

Le chitosan est un polysaccharide dérivé de la chitine, elle-même d'origine naturelle (figure II.9). Ce polymère présente une grande biocompatibilité, des propriétés anti bactériennes, un coût faible et n'est pas toxique.

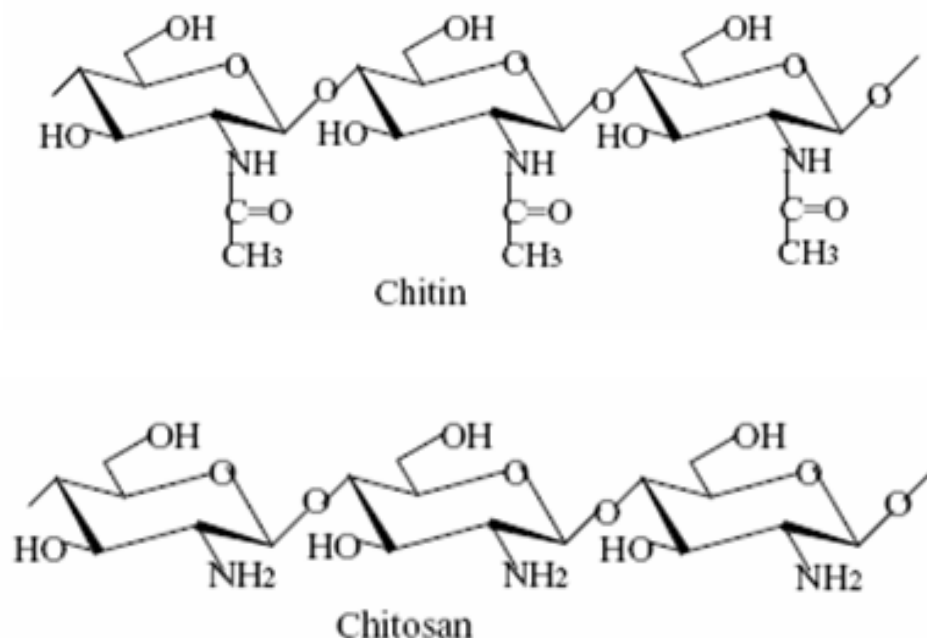
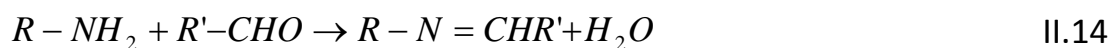


Figure II.9 : Formules développées de la chitine et du chitosan

En 2004, Krajewska et al. répertoriaient dans la littérature près de 63 enzymes immobilisables dans ce polymère, à l'exception notable de la *formate déshydrogénase*. En 2008, Klotzbach et al. mettent en œuvre des dérivés de chitosan, appelés alkylchitosan, en tant que matrice d'immobilisation pour cette enzyme. Ces composés sont obtenus par addition nucléophile d'aldéhydes de tailles variables sur les fonctions amines primaires présentes sur le chitosan, pour former une imine (Eq. II.14).



L'imine, instable, est ensuite réduite en amine secondaire, plus stable, par ajout d'hydrures selon la réaction II.15.



L'alkylchitosan ainsi obtenu présente un caractère hydrophobe croissant avec la taille de la chaîne alkyl. De même, la taille des pores augmente et leur nombre diminue avec cette longueur.

a) Synthèse de l'alkylchitosan

i) Désacétylation du chitosan

Pour être considéré comme du chitosan, la chitine doit être désacétylée à plus de 80%. La désacétylisation consiste à remplacer la fonction $-\text{COCH}_3$ par un proton. Le chitosan utilisé (medium molecular weight chitosan, Sigma) est désacétylé à 85% environ. Or, pour améliorer la modification hydrophobe du polymère, celui-ci doit l'être à 100%. Pour ce faire, le protocole suivant est appliqué. A 100 mL de solution de soude NaOH à 45% massique est ajouté 6,67 g de chitosan dans un flacon autoclavable de 250 mL. La suspension est agitée vigoureusement pendant 10 min pour l'homogénéiser. Le flacon est alors introduit dans un autoclave en prenant soin de le laisser entrouvert pour permettre à la vapeur de s'échapper. Un cycle de 20 min à 121°C est appliquée afin d'obtenir une suspension orange. Celle-ci est alors filtrée et rincée à l'eau ultrapure jusqu'à pH neutre. Le solide est séché sous vide pendant 24h, avant d'être conditionné dans des fioles à l'abri de l'air pour éviter l'absorption d'eau sur le chitosan.

ii) Addition des chaines alkyl

D'après les travaux de Klotzbach (2006), l'alkylchitosan le plus performant, du point de vue de l'activité enzymatique, et suffisamment perméable aux réactifs, est le butylchitosan. Ces travaux se limiteront donc à ce polymère. Le chitosan désacétylé à 100% peut maintenant subir l'addition nucléophile de butanal. Dans un erlenmeyer de 250 mL, 0,5 g de chitosan désacétylé est dissout dans un mélange de 15 mL de méthanol et de 15 mL de solution aqueuse d'acide acétique à 1% volumique. Après 10 min d'agitation, 15 mL de butanal et 0,7 g de cyanoborohydrure de sodium sont introduits. L'agitation est maintenue pendant 10 min supplémentaires. La suspension est ensuite filtrée et le précipité est rincé cinq fois avec 25 mL de méthanol. Le solide est ensuite séché sous vide pendant 24h.

b) Inclusion de l'enzyme

La technique d'inclusion de l'enzyme (couche par couche ou dans le volume) dans la matrice d'immobilisation, est étroitement liée aux conditions dans lesquelles est formé le dépôt de polymère. Le solvant utilisé pour mettre en suspension l'alkylchitosan avant déposition solubilise-t-il l'enzyme ? Reste-t-elle enzymatiquement active ? Cette suspension conduit-elle à une membrane mécaniquement stable ? Le prochain paragraphe traitera de ces questions *via* un certain nombre de tests qualitatifs.

i) Choix du solvant de suspension

Peu de solvants permettent de préparer des suspensions stables ou méta stables d'alkylchitosans. La littérature en retient trois principaux (Klotzbach, 2006): le chloroforme, l'acide acétique à 50% minimum et le 2-méthyl-2-butanol. Même dans

ces solvants, la suspension n'est stable que pour des concentrations de l'ordre de quelques pourcents massiques ; l'ensemble des suspensions préparées le seront donc à 1% massique maximum de chitosan. La solubilité de l'enzyme dans les solvants de suspension est également testée. En effet, si l'enzyme n'est pas soluble, l'inclusion ne pourra se faire que couche par couche ou *via* la formation d'une émulsion entre une solution aqueuse contenant l'enzyme et le solvant contenant le butylchitosan. Enfin, la tolérance de l'enzyme *formate déshydrogénase* vis-à-vis de ces solvants est vérifiée. Les résultats de ces tests qualitatifs sont consignés dans le tableau II.10.

| | Chloroforme | Acide acétique 50% | 2-méthyl-2- butanol |
|--|--------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Stabilité de la suspension (1%) | Métastable | Stable | Stable |
| Solubilité de la <i>formate</i> <i>déshydrogénase</i> | non | oui | non |
| Désactivation par le solvant | non | oui | non |

Tableau II.10 : Résultats des tests de solubilité et d'activité enzymatique dans les différents solvants de suspension du butylchitosan

L'acide acétique 50% dissout l'enzyme mais la désactive également totalement ; en effet, aucune trace d'activité n'est détectée lorsque l'on met en œuvre la réaction II.1 en milieu acide acétique. Ce solvant sera donc exclu de la suite des travaux.

Le chloroforme et le 2-méthyl-2-butanol ne solubilise pas, ou très peu, l'enzyme. Afin de tester l'influence du solvant sur l'activité, l'enzyme, sous forme solide,

est laissée en contact avec 2 mL de solvant pendant 2h. Le solide est ensuite filtré et dissout dans un tampon phosphate pH 7. La réaction II.1 est réalisée directement dans la cuve UV du spectrophotomètre et indique une absence de désactivation.

Au vu de ces résultats, deux techniques d'inclusion de l'enzyme sont envisageables. L'une, dite couche par couche, consiste à déposer le polymère en suspension dans le solvant considéré puis à déposer l'enzyme *via* une phase aqueuse. L'autre consiste à former une émulsion entre la suspension de polymère et la phase aqueuse contenant l'enzyme avant de déposer cette émulsion sur le support d'immobilisation. Ces deux méthodes seront testées avec le 2-méthyl-2-butanol et le chloroforme.

ii) Inclusion *via* une emulsion

A 2 mL de suspension de butylchitosan à 1% massique (chloroforme ou 2 méthyl-2-butanol) est ajouté 0,5 mL de solution d'enzyme *formate déshydrogénase* à 1 g.L⁻¹ dans un tampon phosphate pH 7. L'émulsion est réalisée à l'aide d'un ultraturrax. Dans le cas du 2-méthyl-2-butanol, il se forme une seule phase correspondant à l'émulsion alors que dans le cas du chloroforme, il se forme deux phases. La phase légère correspond à l'émulsion, l'autre au chloroforme. De plus, l'émulsion est très instable et décante entièrement en l'espace d'une minute. Le dépôt de l'émulsion est donc réalisé immédiatement après sa formation.

Un volume d'émulsion de 100 $\mu\text{L.cm}^{-2}$ est déposé sur une plaque d'or de 65 mm² et séché sous hotte puis sous vide pendant 30 min. Préalablement à toute mesure de l'activité enzymatique, chaque dépôt est immergé dans 2 mL de tampon phosphate pH 7 pendant 2h pour quantifier le relargage d'enzymes du dépôt vers la solution. Le surnageant est ensuite récupéré et la quantité d'enzyme présente en

solution est caractérisée. L'expérience est renouvelée jusqu'à l'absence totale d'activité enzymatique dans le surnageant. L'activité du dépôt peut alors être mesurée en introduisant directement le support en or dans la cuve UV du spectrophotomètre.

Les résultats indiquent une activité enzymatique importante dans le surnageant mais aucune rétention enzymatique quelque soit le solvant employé. Dès le premier lavage, l'ensemble de l'enzyme se retrouve en solution et le dépôt ne présente plus aucune activité. Cette observation s'explique par la différence de volatilité entre le solvant et la phase aqueuse. En effet, lors du séchage, l'émulsion se démixe car le solvant (chloroforme ou 2-méthyl-2-butanol) s'évapore plus vite que la phase aqueuse. L'enzyme, qui se retrouve en solution au dessus de la matrice de polymère, se dépose alors en surface. L'enzyme n'est donc pas encapsulée dans le polymère.

iii) Inclusion couche par couche

Au vu des résultats précédents, l'inclusion couche par couche semble plus adaptée à la problématique. Le principe consiste à former une première couche de polymère, dite d'accroche, sur le support d'immobilisation avant de déposer une couche d'enzyme puis une autre couche de polymère. Des suspensions de butylchitosan à 1% massique (chloroforme et 2-méthyl-2-butanol) sont préparées et agitées 30 secondes environ à l'aide d'un ultraturrax. $60 \mu\text{L.cm}^{-2}$ sont prélevés et déposés sur une plaque d'or de 65 mm^2 et séché à l'air libre. La couche d'enzyme est ensuite formée par dépôt et séchage de $30 \mu\text{L.cm}^{-2}$ d'une solution d'enzymes fraîchement préparée à $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ dans l'eau ultrapure. Une seconde couche de polymère formée de la même manière que la première est ajoutée et la plaque est séchée sous vide pendant 30 min. Le relargage d'enzyme vers la solution est caractérisé en laissant tremper le dépôt dans 2 mL de tampon phosphate pendant 1h, l'expérience étant renouvelée jusqu'à l'absence totale d'enzyme dans le surnageant. Lorsque le relargage devient nul, l'activité catalytique du

dépôt peut être testée en introduisant directement la plaque support dans la cuve du spectrophotomètre.

Pour le dépôt formé à l'aide d'une suspension dans le 2-méthyl-2-butanol, la totalité de l'enzyme passe en solution dès le premier lavage et le dépôt ne présente plus aucune activité enzymatique. La résistance mécanique des membranes formées dans ce solvant semble être la cause principale de ce phénomène. En effet, celle-ci se délite partiellement une fois mise en contact avec une solution aqueuse. Les interactions entre le solvant et le butylchitosan, de même que les vitesses de séchage différentes entre les solvants semblent avoir une influence importante sur la structure finale du dépôt.

Pour le chloroforme, en revanche, les résultats indiquent une rétention de l'enzyme par le dépôt. L'absorbance à 340 nm enregistrée à 38°C après 30 min de réaction entre le surnageant (issue des lavages) et la solution de substrats est représentée en fonction du nombre d'expériences de lavage sur la figure II.11.

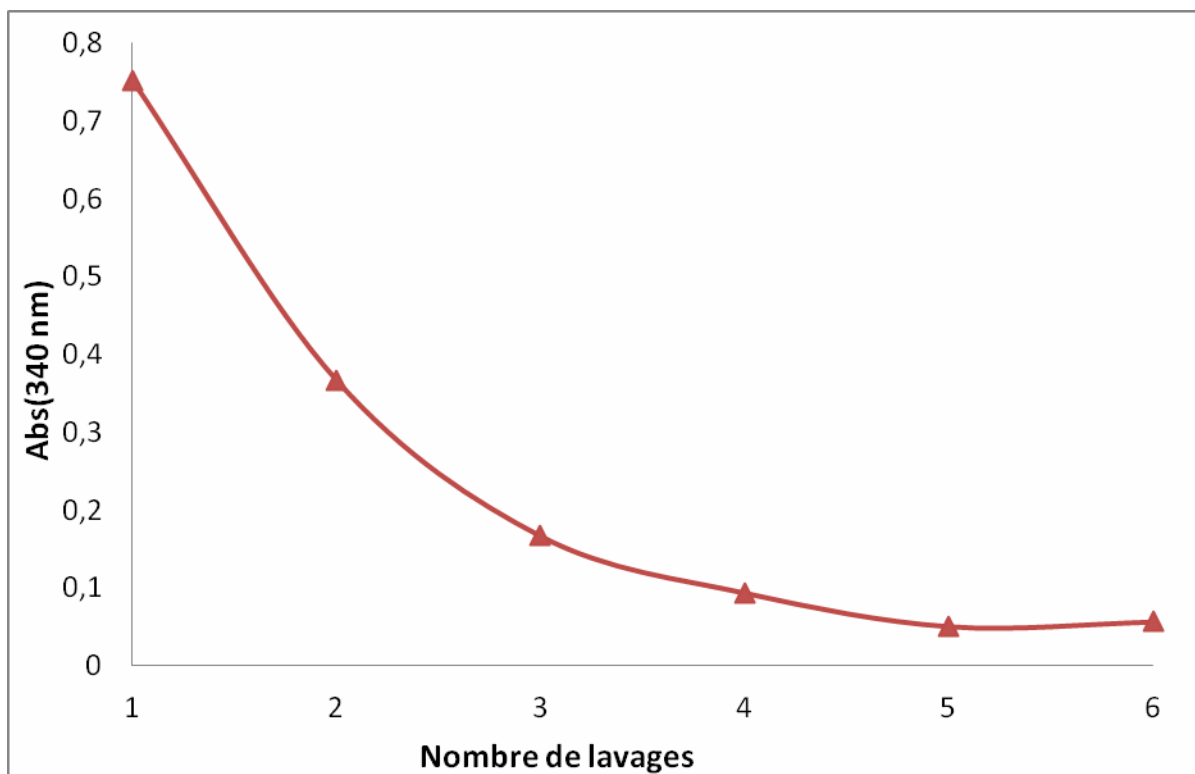


Figure II.11 : Absorbance à 340 nm enregistrée après 30 min de réaction à 38 °C entre 1 mL surnageant et 1 mL de solution de NAD^+ à $0,4 \text{ mmol.L}^{-1}$ et de HCOO^- à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ en fonction du nombre de relavage

Après le 5^{ème} lavage, la matrice formée par une suspension de butylchitosan dans le chloroforme cesse de relarguer l'enzyme et l'activité catalytique du dépôt est mesurée en introduisant directement le support en or dans la cuve UV du spectrophotomètre. Dans les mêmes conditions de température et de concentrations, l'absorbance à 340 nm après 30 min de réaction est de 0,87. La quantité faiblement retenue reste importante et implique que la charge enzymatique initiale du dépôt soit optimisée. Cependant, l'inclusion de la *formate déshydrogénase* entre deux couches de butylchitosan déposées *via* une suspension dans le chloroforme est une technique d'immobilisation viable qui ne désactive pas l'enzyme et permet la diffusion des substrats et des produits de réaction à travers la matrice.

V. Conclusion

Sur l'ensemble des techniques d'immobilisation de l'enzyme *formate déshydrogénase* envisagé, seule la matrice de butylchitosan formée après suspension dans le chloroforme répond à la problématique. L'adsorption de l'enzyme sur un support d'or ne permet pas de retenir suffisamment de catalyseur pour mener à bien un procédé de régénération de NADH, et ce, quelque soit l'état de surface de l'or. Le Nafion® modifié par ajout de sels d'alkylammonium ou d'alkylphosphonium, n'a pas permis non plus d'immobiliser l'enzyme. Le solvant de suspension (éthanol ou méthanol) semble responsable de la désactivation enzymatique lors de son inclusion dans le volume et les membranes formées couche par couche ne présentent pas une résistance mécanique suffisante. En revanche, une matrice de butylchitosan formée par dépôt d'une suspension dans le chloroforme répond aux deux critères définis en introduction de ce chapitre. L'enzyme, insoluble dans le chloroforme, n'est pas désactivée et présente une activité enzymatique non altérée après sa mise en contact avec le solvant. Après avoir évacué l'enzyme peu ou pas immobilisée par le dépôt, la réaction de régénération de NADH (Eq. II.1) a été conduite, démontrant ainsi que NAD^+ et NADH sont susceptibles de diffuser à travers la matrice.

Références

Angerstein-Kozłowska, H., Conway, B., Hamelin, A., Stoicoviciu, L., *Electrochimica Acta*, vol.31 (1987) 1051.

Balasubramanian, S., Revzin, A., Simonian, A., *Electroanalysis*, vol.18 (2006) 1885-1892.

Kato, N., Sahm, H., Wagner, F., "Steady-state kinetics of formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenase from a methanol-utilizing yeast, *Candida Boidinii*", *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 566 (1979) 12-20.

Klotzbach, T., Watt, M., Ansari, Y., Minter, S., "Effects of hydrophobic modification of chitosan and Nafion on transport properties, ion-exchange capacities, and enzyme immobilization", *Journal of Membrane Science*, vol. 282 (2006) 276-283.

Klotzbach, T., Watt, M., Ansari, Y., Minter, S., "Improving the microenvironment for enzyme immobilization at electrodes by hydrophobically modifying chitosan and Nafion polymers", *Journal of Membrane Science*, vol. 311 (2008) 81-88.

Krajewska, B., "Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilization: a review", *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 35 (2004) 126-139.

Mesentsev, A., Lamzin, V., Tishkov, V., Ustinnikova, T., Popov, V., "Effect of pH on kinetic parameters of NAD⁺ dependent formate dehydrogenase", *Biochem. J.*, vol. 321 (1997) 475-480.

Moore, C., Akers, N., Hill, A., Johnson, Z., Minter, S., "Improving the environment for immobilized dehydrogenase enzymes by modifying Nafion with tetraalkylammonium bromides", *Biomacromolecules*, vol. 5 (2004) 1241-1247.

Moore, C., Hackman, S., Brennan, T., Minter, S., "Effect of mixture casting phosphonium salts with Nafion on the proton exchange capacity and mass transport through les membranes", *Journal of Membrane Science*, vol. 254 (2005) 63-70.

Parra, A., Casero, E., Pariente, F., Vazquez, L., Lorenzo, E., "Cholesterol oxydase modified gold electrodes as bioanalytical devices", *Sensors and Actuators B*, vol. 124 (2007) 30-37.

Yon-Kahn, J., Hervé, G., "Enzymologie moléculaire et cellulaire", *Ed. EDP Sciences*, (2005)

Chapitre III : Procédé de régénération enzymatique continue de NADH en réacteur filtre-presse – Optimisation et caractérisation

SOMMAIRE

| | | |
|------|---|-----|
| I. | Introduction..... | 115 |
| II. | Le microréacteur multicanaux de type filtre presse..... | 116 |
| III. | Optimisation de la quantité d'enzymes immobilisée..... | 120 |
| | 1) Protocole expérimental..... | 120 |
| | 2) Résultats et interprétations..... | 121 |
| IV. | Durée de vie de l'enzyme immobilisée..... | 126 |
| V. | Influence du débit et recyclage continu..... | 128 |
| | 1) Influence du débit de circulation..... | 128 |
| | 2) Recyclage continu..... | 132 |
| VI. | Application à la synthèse du L-lactate..... | 136 |
| | 1) Protocole d'analyse..... | 137 |
| | 2) Résultats et interprétations..... | 138 |
| VII. | Conclusion..... | 141 |

I. Introduction

La technique d'immobilisation enzymatique de la *formate déshydrogénase* ayant été mise au point au chapitre précédent, son application dans le cadre d'un procédé de régénération continu et *in situ* de NADH est l'objet du présent chapitre. Après avoir présenté le microréacteur développé au laboratoire, la démarche consistera d'abord à optimiser la quantité d'enzyme incluse dans la matrice d'immobilisation, afin de maximiser l'activité de la couche catalytique, tout en quantifiant le phénomène de relargage de protéines du dépôt vers la solution. La durée de vie de l'enzyme immobilisée sera également déterminée en conduisant le procédé, sans interruption, pendant plusieurs semaines. L'aspect hydrodynamique sera ensuite abordé *via* une étude de l'influence du débit au sein du réacteur sur la conversion et la production de NADH en continu. Plusieurs modes de fonctionnement seront présentés, avec ou sans recyclage ; le recyclage pouvant être lui-même en mode continu ou discontinu. Enfin, ce système de régénération de NADH sera appliqué *in situ* lors d'une synthèse enzymatique modèle NAD-dépendante d'un produit chiral, le L-lactate.

II. Le microréacteur multicanaux de type filtre presse

Le procédé de régénération enzymatique de NADH, est conduit dans un réacteur électrochimique multicanaux conçu au laboratoire, lors d'une thèse précédente (Kane, 2005). Un schéma du réacteur complet est présenté figure III.1.

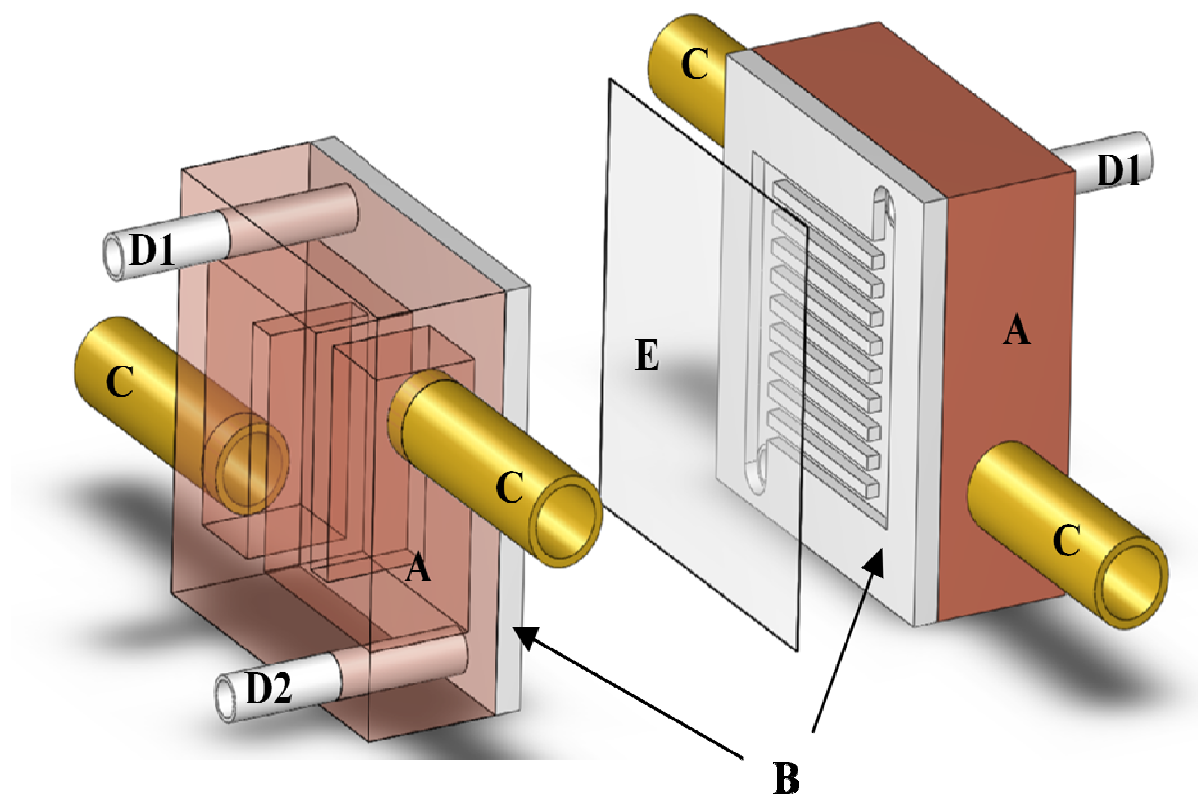


Figure III.1 : Représentation schématique du microréacteur multicanaux conçu au LGC. (A) Echangeur thermique ; (B) Electrodes micro-structurées ; (C) Entrée et sortie des fluides caloporteurs ; (D1), (D2) Entrée et sortie des fluides à traiter ; (E) Membrane échangeuse d'ions (optionnelle).

Schéma réalisé par S. Orioux, ICA, INSA Toulouse, France

Les électrodes microstructurées présentent 130 canaux hémicylindriques de 160 μm de diamètre gravés par électroérosion sur des plaques d'or et de platine massives de dimension ($L \times l \times e = 5 \text{ cm} \times 5 \text{ cm} \times 2 \text{ mm}$). La gravure a été réalisée par la société *Cristin Electro Erosion* (Montauban, France). De part et d'autre de la microstructure sont gravés deux canaux beaucoup plus larges, dit distributeur et collecteur, qui permettent respectivement de répartir et de collecter les flux des différents canaux de réaction. Un schéma de ces plaques supports est présenté figure III.2.

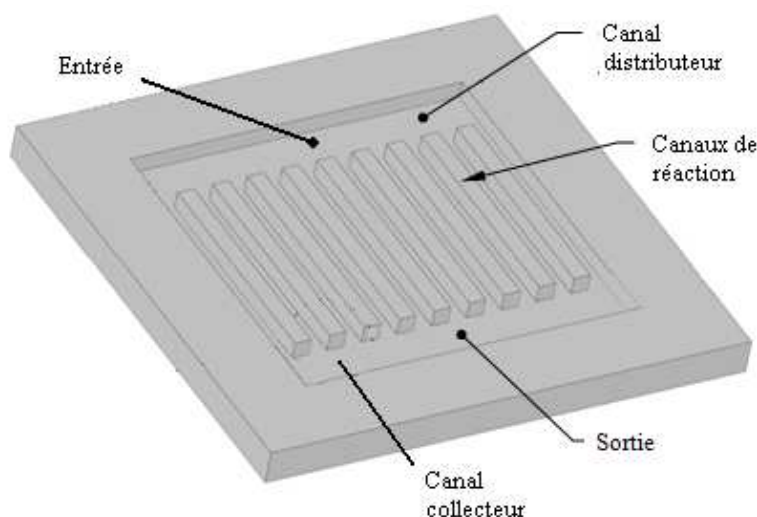


Figure III.2 : Représentation schématique d'une plaque support microstructurée
(Les dimensions ne sont pas à l'échelle)

Ces électrodes sont montées en vis-à-vis dans une structure filtre-presse, entre deux blocs de cuivre qui constituent les échangeurs thermiques. Ceux-ci permettent une régulation fine de la température au sein du volume réactionnel et permettent ainsi d'éviter les points chauds. En effet, le rapport élevé entre la surface de

contact et le volume du mélange à traiter, améliore significativement les transferts de chaleur par rapport aux réacteurs conventionnels. Ce rapport surface/volume est, dans le cas du réacteur microstructuré, d'environ 200 cm^{-1} contre $0,1$ à 1 cm^{-1} pour les réacteurs conventionnels. Afin d'assurer le maintien de la structure, l'ensemble de ces éléments sont insérés dans un bloc de PTFE et un cadre en acier. L'étanchéité est assurée par une plaque comprimée à l'aide d'une vis à pas fin. Une vue éclatée du microréacteur est présentée sur la photo III.3.

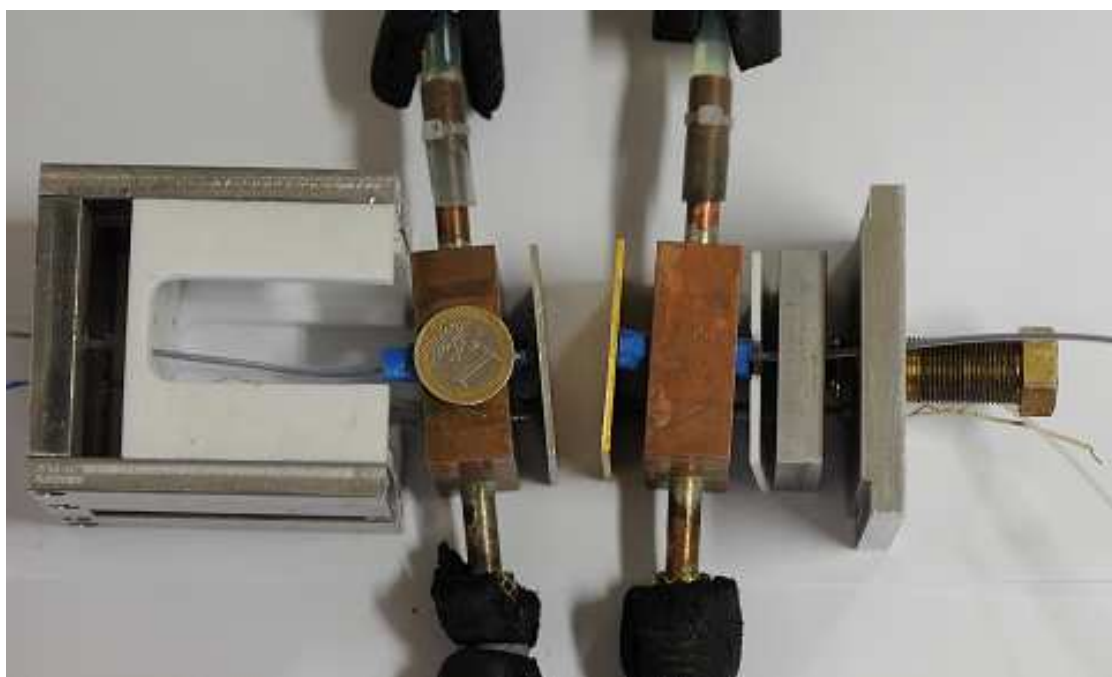


Figure III.3 : Photographie du microréacteur éclaté

Ce réacteur, initialement prévu pour conduire des procédés électrochimiques, est utilisé, dans cette étude, pour accueillir la matrice d'immobilisation de l'enzyme *formate déshydrogénase*. Les électrodes microstructurées ne seront donc pas employées en tant que telles, mais en tant que plaques supports. Un cadre en teflon d'un mm

d'épaisseur est utilisé pour espacer légèrement les deux plaques supports pour permettre à la solution de circuler entre les deux couches catalytiques.

Il est à noter que, parallèlement à ce travail, un microréacteur de 2nd génération a été développé au laboratoire, en collaboration avec l'INSA de Toulouse (thèse de Cyril Renaud, 2011). Dans ce nouveau réacteur, la géométrie optimisée des canaux distributeur et collecteur entraîne une meilleure répartition des pertes de charge, et donc des débits, entre les différents canaux de réaction. Cependant, la concomitance des deux thèses et les délais de fabrication des réacteurs ont imposé l'usage du réacteur de 1^{ère} génération pour ces travaux de thèse.

III. Optimisation de la quantité d'enzymes immobilisée

Lors des premiers essais de confinement d'enzyme dans le chitosan modifié, il a été observé qu'une quantité non-négligeable de catalyseur n'était que peu ou pas retenue par la matrice. La première étape de mise au point d'un procédé de régénération de NADH s'intéresse donc, d'une part, à déterminer une quantité maximale d'enzyme immobilisable par unité de masse de dépôt, et d'autre part, à quantifier la part d'enzyme relarguée. Pour cela, la démarche consiste à fixer une masse de dépôt de chitosan par une unité de surface de plaque support, puis à faire varier la quantité d'enzyme *formate déshydrogénase* incluse dans la matrice. L'activité catalytique du dépôt après relargage ainsi que la quantité de protéines relarguées seront déterminées afin de dégager les conditions opératoires les plus favorables.

1) Protocole expérimental

Sur une plaque support en or de 25 cm², sont déposés et séchés 2 ml d'une suspension de butylchitosan à 1% massique dans le chloroforme, préalablement agité à l'ultraturax. Ce 1^{er} dépôt permet de former la couche d'accroche de l'enzyme. Ceci conduit à une densité de matrice sèche de 1,2 mg.cm⁻². Au dessus de cette première couche, 1 ml de solution aqueuse d'enzymes *formate déshydrogénase* de concentration variable est déposé et séché. Enfin, une seconde couche de butylchitosan, formée de manière identique à la première, est déposée au dessus pour former la matrice d'inclusion complète. La plaque fonctionnalisée est alors séchée sous vide pendant 30 minutes.

La quantité d'enzyme relarguée en solution est ensuite mesurée en déposant du tampon phosphate pH 7 sur la plaque, thermostatée à 38°C pour simuler

les conditions expérimentales du futur procédé. Au bout de 15 min, le surnageant est recueilli et son volume est réajusté avec du tampon phosphate afin de compenser l'évaporation. La quantité d'enzymes relarguée, présente dans le surnageant, est caractérisée et quantifiée par spectrophotométrie UV à 340 nm (cf protocole Chap. II, II.2). La vitesse initiale de formation de NADH, calculée à partir de la pente à l'origine de la courbe $[NADH]=f(t)$ permet de déterminer la quantité d'enzyme présente en solution. Cette expérience est renouvelée jusqu'à absence totale d'enzyme dans le surnageant.

Les activités catalytiques des différents dépôts peuvent maintenant être caractérisées avec l'assurance que celles-ci sont bien dues à de l'enzyme immobilisée. Pour ce faire, une solution de tampon phosphate contenant NAD^+ ($0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$) et le formate ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) est déposée sur la plaque support fonctionnalisée, thermostatée à 38°C pendant 60 min. L'absorbance UV du surnageant est mesurée à 340 nm. La quantité de NADH formée est caractéristique de l'activité enzymatique du dépôt, et permet donc d'évaluer l'efficacité de l'immobilisation.

2) Résultats et interprétation

La quantité d'enzyme introduite initialement dans la matrice est contrôlée en faisant varier la concentration de la *formate déshydrogénase* dans la solution utilisée pour réaliser le dépôt. L'activité, en U par mg de solide, du lot d'enzyme utilisé pour ces expériences, est préalablement déterminée en solution. Le tableau III.4 indique, les masses d'enzymes introduites et leurs équivalents en unité U.

| | | | | | | | |
|--|------|------|------|-----|------|------|-----|
| Masse introduite (mg) | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,5 | 0,6 | 0,8 | 1 |
| Nombre d'unités U introduit | 0,12 | 0,24 | 0,48 | 0,6 | 0,72 | 0,96 | 1,2 |

Figure III.4 : Masse et nombre d'unités d'enzyme introduites dans les différentes matrices de butylchitosan avant lavage

L'efficacité catalytique de la matrice, après relargage, représentée ici par la concentration de NADH formé après 1h de réaction, est représentée à la figure III.5 en fonction du nombre d'unités enzymatiques introduites initialement dans le dépôt. Il est à noter que le temps de réaction a été choisi pour maximiser l'avancement de la réaction sans pour autant atteindre une conversion totale. En effet, la quantité de catalyseur doit être limitante de l'avancement, enregistré au bout de 60 min, afin de déterminer les conditions les plus favorables.

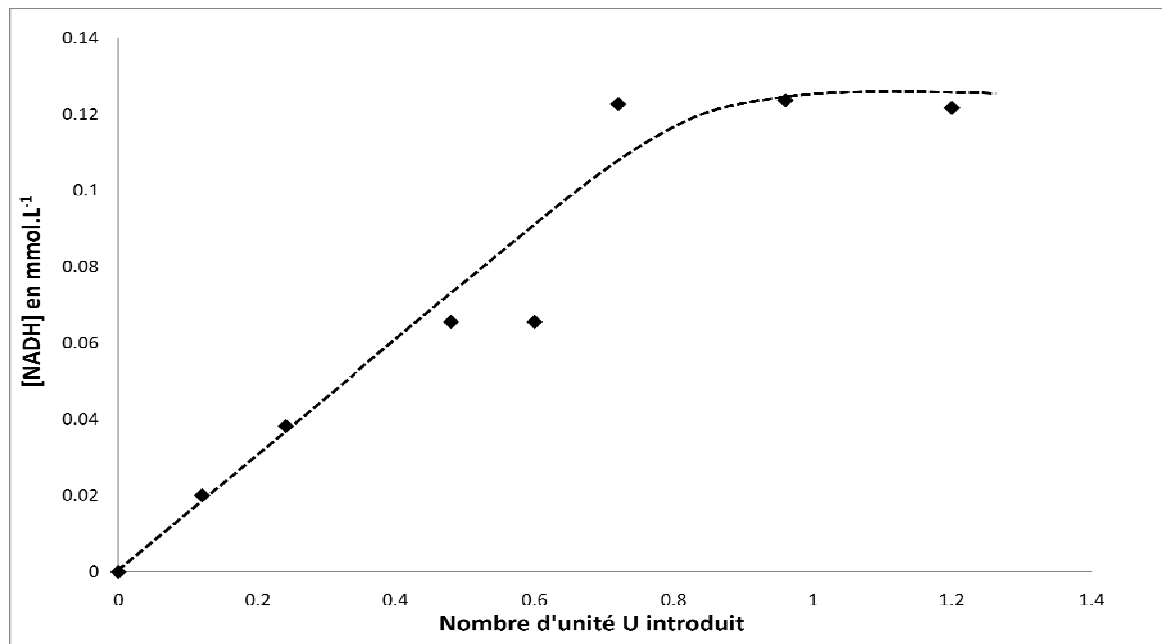


Figure III.5 : Concentration de NADH formé à 38 °C après 60 min de réaction, dans une solution de tampon phosphate contenant initialement NAD^+ à $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ et HCOO^- à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ en fonction du nombre d'unité enzymatique de formate déshydrogénase introduit initialement dans la matrice d'immobilisation de butylchitosan.

Les conditions opératoires induisant la meilleure activité catalytique de la matrice d'immobilisation sont atteintes pour environ 0,72 U introduite, soit 24 U.g⁻¹ de butylchitosan. En effet, en deçà de cette valeur, l'activité catalytique du dépôt après lavage diminue. Au contraire, au-delà de 0,72 U introduites, l'activité enzymatique stagne. L'hypothèse émise pour expliquer ce phénomène est que l'enzyme supplémentaire n'est pas retenue par la matrice mais entièrement relarguée lors de l'étape de lavage. Cette valeur optimisée de concentration d'enzymes introduite dans le dépôt sera conservée tout au long des études qui vont suivre.

Reste à savoir quelle part de l'enzyme a été relarguée et quelle part a été effectivement retenue par la matrice d'immobilisation. Pour cela, les vitesses initiales de formation de NADH issues des solutions de lavages chargées en FDH relarguées, sont calculées, afin de déterminer la masse d'enzyme passée du dépôt vers la solution, à chaque lavage. La figure III.6 présente l'évolution de la concentration en NADH formé par l'enzyme non retenue dans le polymère, présente dans la solution de lavage, au cours des deux premières minutes de réaction.

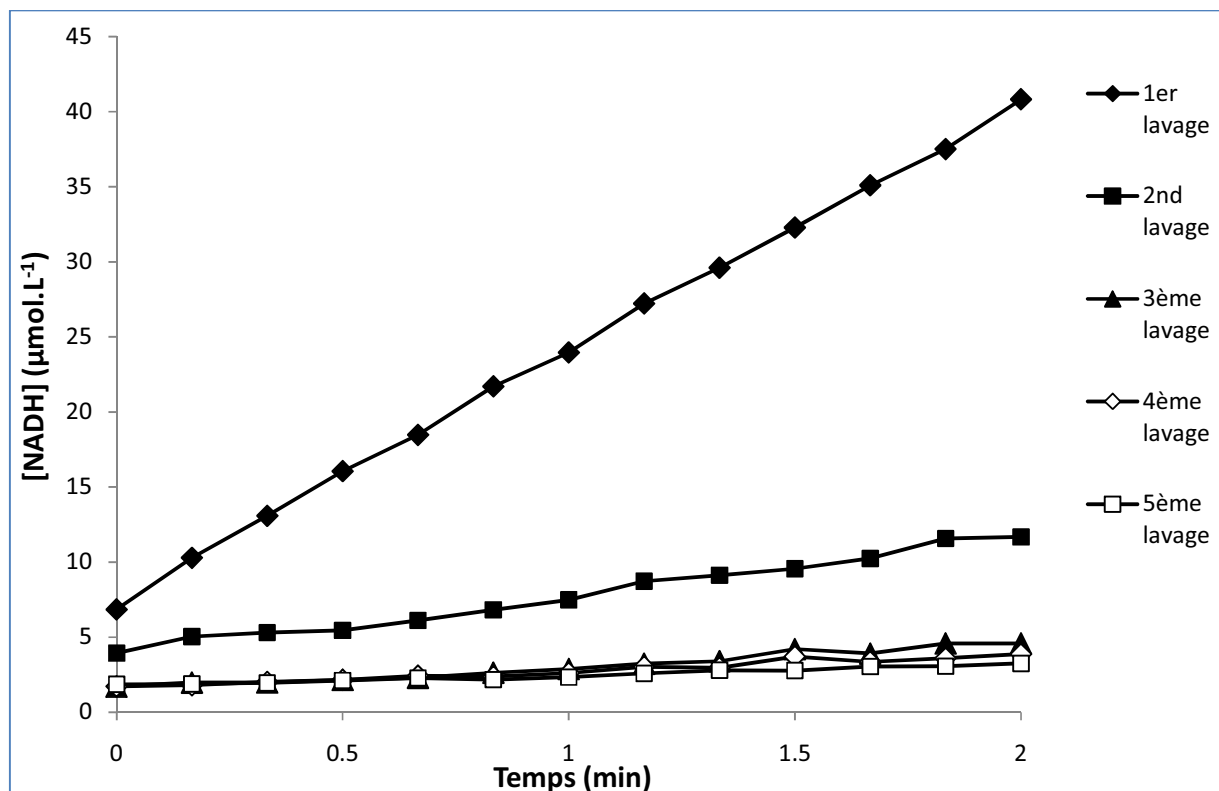


Figure III.6 : Concentration en NADH formé par l'action du formate en présence d'enzymes issues des relargages du dépôt optimisé (24 U.g^{-1}). Concentrations initiales : $[\text{NAD}^+]=0,4 \text{ mmol.L}^{-1}$ et $[\text{HCOO}^-]=0,10 \text{ mol.L}^{-1}$; $T=38^\circ\text{C}$.

L'activité spécifique du lot d'enzyme utilisé pour ces expériences est, tout d'abord, déterminée en solution. L'expérience est renouvelée trois fois pour s'assurer de la reproductibilité et donne une valeur moyenne d'activité spécifique (dans les conditions opératoires choisies et à 38°C), de $0,64 \text{ } \mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ d'enzyme. Cette valeur permet de déterminer la quantité d'enzyme recueillie dans le surnageant à l'aide des vitesses initiales de formation de NADH, représentées par les pentes des droites de la figure III.6. Le nombre d'unités U d'enzyme passé en solution à chaque lavage ainsi que la proportion que cela représente, sur les $0,72 \text{ U}$ introduites initialement, est présenté tableau III.7.

| | 1 ^{er} lavage | 2 nd lavage | 3 ^{ème} lavage | 4 ^{ème} lavage | 5 ^{ème} lavage |
|-----------------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Quantité relarguée (eq. U) | 0,093 | 0,022 | 0,008 | 0,006 | 0,004 |
| Taux de relargage (%) | 12,92 | 3,06 | 1,11 | 0,83 | 0,55 |

Tableau III.7 : Nombre d'unité et pourcentage d'enzyme relarguée par le dépôt optimisé contenant initialement 0,72 U en fonction du nombre de lavages.

En valeur cumulée, la quantité d'enzyme non retenue par le dépôt représente 18,5% de la quantité initialement introduite. La même expérience, renouvelée avec un lot d'enzymes distinct donne un pourcentage d'enzyme relarguée de 22,2%.

Il est à noter qu'une configuration superposant plusieurs fois le motif matrice/enzyme/matrice sur la plaque support a également été testée. Aucune amélioration notable de l'activité catalytique n'a cependant été mesurée. Par la suite, seul le motif unique matrice/enzyme/matrice sera utilisé.

En conclusion, une quantité d'enzyme de 24 U.g⁻¹ de butylchitosan a été déterminée expérimentalement et permet de maximiser l'activité catalytique du dépôt. C'est cette concentration qui a été choisie pour la suite de l'étude. Dans ces conditions, environ 80% du catalyseur est retenue par la matrice.

IV. Durée de vie de l'enzyme immobilisée

Un des critères essentiels à la viabilité du procédé enzymatique de régénération de NADH, est la durée de vie du catalyseur une fois immobilisé. La bibliographie a montré que, de manière générale, l'immobilisation d'une enzyme pouvait augmenter sa durée de vie, ou au contraire, la diminuer. A notre connaissance, en ce qui concerne la *formate déshydrogénase*, une des meilleures performances en termes de durée de vie a été obtenue par Groger et *al.* (2003) avec 65h de fonctionnement en continu de l'enzyme, en milieu biphasique eau/hexane. Les auteurs annoncent une activité résiduelle de 90% après ces 65h, mais n'indiquent pas l'évolution de l'activité au delà de 3 jours.

L'objectif de ce paragraphe, consiste à mesurer l'activité enzymatique du dépôt via la quantité de NADH formé à 38°C en sortie du réacteur au cours du temps, la réaction étant menée en continu, sans interruption. La première concentration en NADH produit, obtenue après mise en régime hydrodynamique du réacteur, est prise comme valeur de base et les concentrations mesurées par la suite sont indiquées en pourcentage de cette valeur initiale, traduisant ainsi l'évolution de l'efficacité catalytique du dépôt au cours du temps. La courbe obtenue est représentée figure III.8.

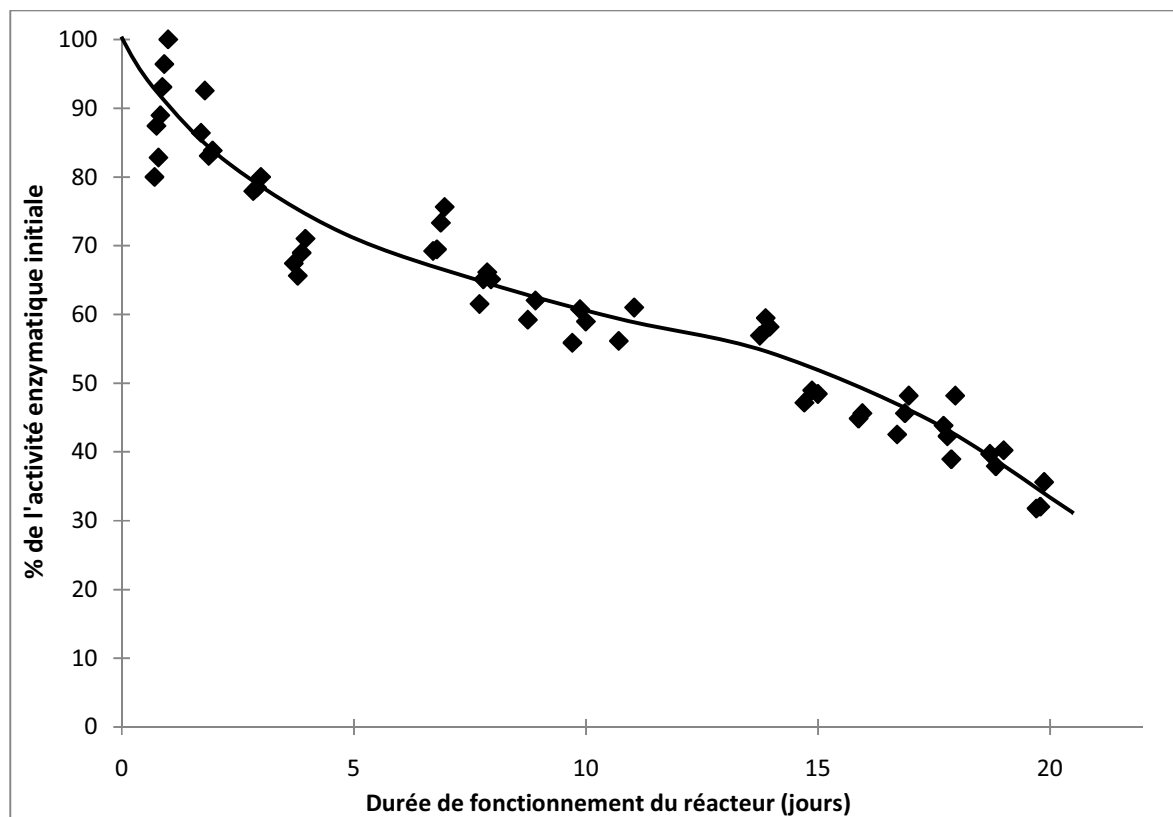


Figure III.8 : Pourcentage de l'activité enzymatique initiale lors du fonctionnement en continu du microréacteur contenant les deux plaques support fonctionnalisées à 24 U.g^{-1} . Solution en entrée : $[\text{NAD}^+] = 0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, $[\text{HCOO}^-] = 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ dans un tampon phosphate pH 7. Débit : $63 \mu\text{L.min}^{-1}$; $T = 38^\circ\text{C}$.

L'activité enzymatique atteint la moitié de sa valeur initiale après 14 jours de catalyse ininterrompue. Après 3 semaines, 30% de l'activité initiale est encore détectable. La biocompatibilité importante des alkylchitosans, annoncée au chapitre I, est ainsi confirmée. Cette durée de vie constitue une performance remarquable pour l'enzyme *formate déshydrogénase* et confirme le choix initial de la méthode d'immobilisation. Cette durée de vie importante justifie du dépôt d'un brevet national, financé par l'Université Paul Sabatier et le CNRS (Roche et al., 2010).

V. Influence du débit et du recyclage continu

La quantité de FDH immobilisée étant optimisée, la production de NADH en régime continu dans le réacteur peut être envisagée. Cette partie de l'étude consiste à étudier l'influence de l'hydrodynamique sur le procédé de régénération de NADH *via* la variation des débits de circulation de la solution à traiter, contenant le cofacteur oxydé NAD^+ et le formate HCOO^- .

1) Influence du débit de circulation

La matrice d'immobilisation en butylchitosan contenant la *formate déshydrogénase* est maintenant déposée sur les deux plaques support du microréacteur selon le protocole développé au paragraphe III de ce chapitre. Le réacteur est monté dans sa structure en acier, thermostaté à 38°C, et une solution de tampon phosphate circule à un débit de 380 $\mu\text{l}.\text{min}^{-1}$ pour laver le dépôt de son enzyme peu ou pas immobilisée. La présence d'enzymes relarguées dans le tampon est vérifiée par spectrophotométrie jusqu'à absence totale d'activité catalytique dans les solutions de lavages (entre 5 et 6 lavages de 20 min sont nécessaires).

Le tampon phosphate est alors remplacé par la solution à traiter contenant le substrat formate et le cofacteur NAD^+ . La solution est collectée en sortie pendant des intervalles de 15 min et analysée, toujours par spectrophotométrie.

La figure III.9 présente la concentration en NADH formé en sortie du microréacteur, cumulée pendant 15 min, pour trois débits de solution d'alimentation.

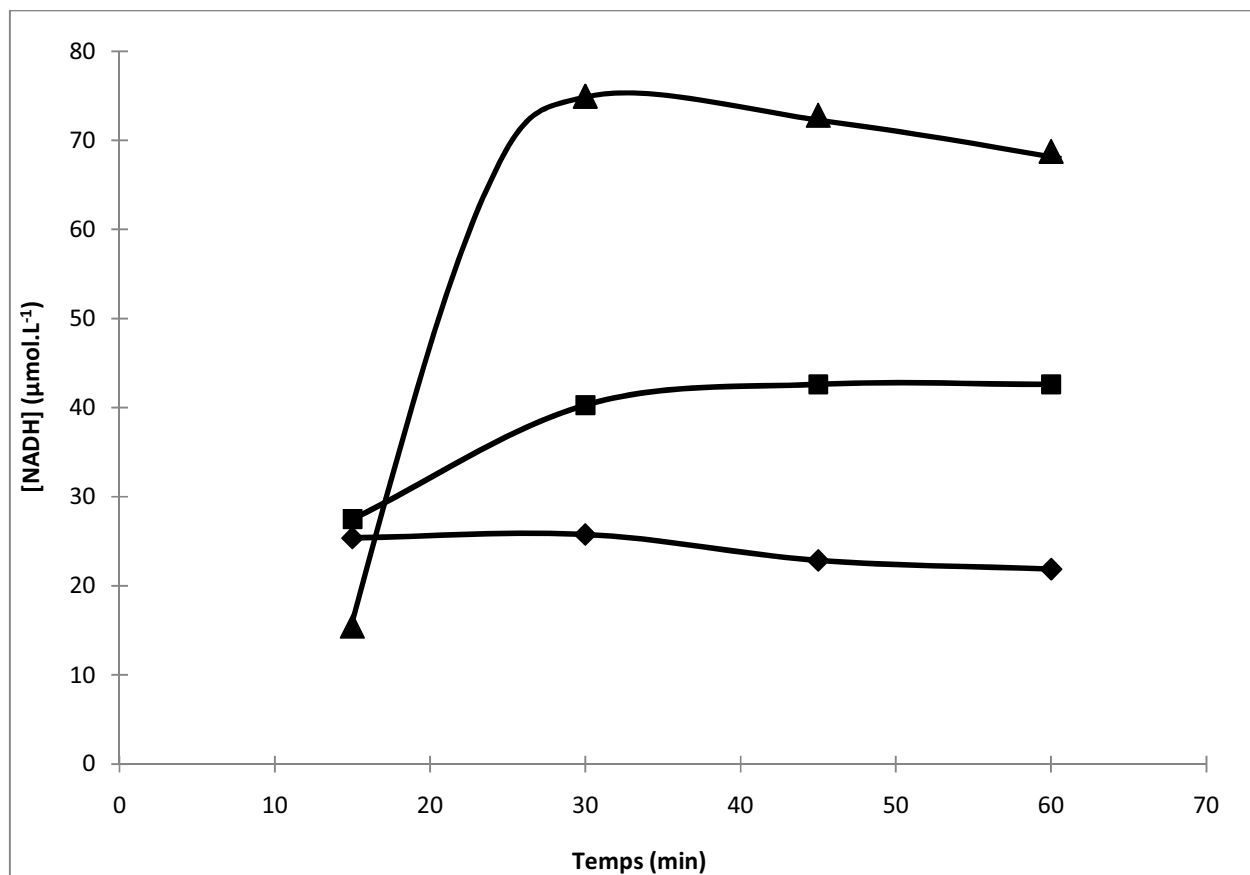


Figure III.9 : Evolution de la concentration de NADH formé en sortie du microréacteur en fonction du temps pour 3 débits. Solution initiale: tampon phosphate pH=7, $[NAD^+]=0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, $[HCO_2^-]=0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $T=38^\circ\text{C}$. ▲ $63 \text{ } \mu\text{L.min}^{-1}$; ■ $127 \text{ } \mu\text{L.min}^{-1}$; ◆ $380 \text{ } \mu\text{L.min}^{-1}$

Les fortes variations de conversion en début de réaction sont attribuées à la mise en régime du réacteur et sont d'autant plus importantes que le débit est faible. En effet, au bout de 30 min de réaction, la conversion est stable pour les deux débits les plus importants contrairement au débit le plus faible.

Pour des débits de 63, 127 et $380 \text{ } \mu\text{L.min}^{-1}$, les taux de conversion obtenus avec une concentration initiale en NAD^+ de $500 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ sont respectivement de 14, 9 et 5%. La diminution des taux de conversion avec l'augmentation du débit s'explique par la diminution du temps de séjour de la solution dans le réacteur.

Cependant, si l'on s'intéresse, non plus à la conversion, mais à la production de NADH par unité de temps et de surface fonctionnalisée, l'influence des débits est inversée. La figure III.10 présente l'évolution de la quantité de NADH formé en sortie du microréacteur par heure et par m^2 de dépôt au cours du temps pour ces trois mêmes débits.

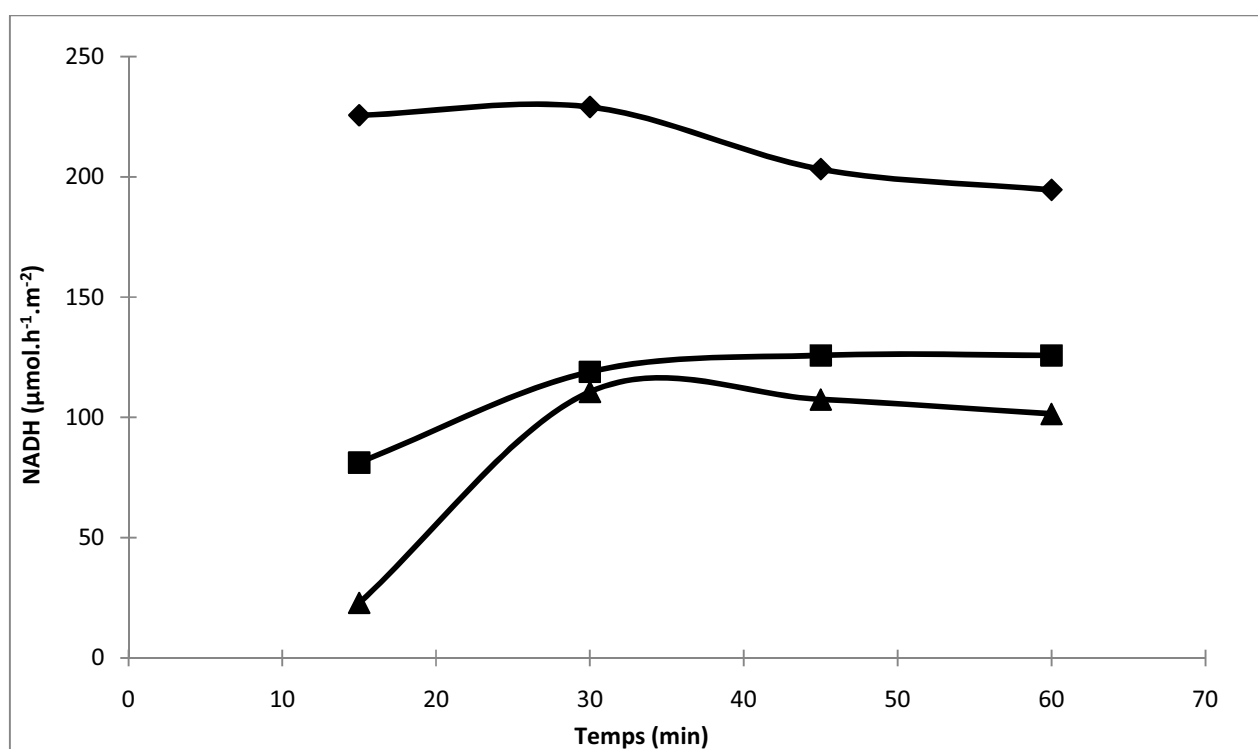


Figure III.10 : Production de NADH en sortie du microréacteur par heure et par m^2 de dépôt en fonction du temps pour 3 débits. Solution initiale : tampon phosphate pH=7, $[NAD^+]=0,5$ mM, $[HCO_2^-]=0,1$ M, $T=38^\circ C$ ▲ $63 \mu l.min^{-1}$; ■ $127 \mu l.min^{-1}$; ◆ $380 \mu l.min^{-1}$

Le modèle de la catalyse hétérogène avec diffusion à travers une structure poreuse considère trois étapes pouvant être limitantes:

- limitation chimique : la vitesse de réaction est faible devant les vitesses de diffusion interne (à travers le film de chitosan) et externe (au sein de la solution).

- limitation par diffusion interne: la vitesse de diffusion à travers les pores du film est faible devant les vitesses de réaction et de diffusion dans la solution. Dans ce cas, la convection n'améliore pas le flux de matière et le taux de conversion est proportionnel au temps de séjour, et donc au débit.

- limitation par diffusion externe : la vitesse de diffusion au sein de la solution est faible devant les vitesses de réaction et de diffusion interne. Un gradient de concentration de réactif et/ou de produit au voisinage de la couche poreuse est alors présent dans la solution. Dans ce cas, l'épaisseur de cette couche diminue avec l'augmentation de la convection, et le flux de matière augmente.

Ces trois mécanismes représentent des cas limites et un régime mixte ne peut être formellement exclu *a priori*.

Or, d'après la figure III.10, dans cette gamme de débits, la quantité de NADH produite est plus importante à débit élevé qu'à faible débit. En première approximation, le procédé semble donc plutôt limité par la diffusion externe des réactifs et/ou des produits.

Cependant, en fin d'expérience, le réacteur est démonté, et une observation visuelle des plaques supports fonctionnalisées montre la présence de zones sèches, n'ayant pas été en contact avec la solution contenant les substrats. Ce phénomène est d'autant plus marqué que le débit est faible. L'apparition de zones mortes au sein du réacteur, dont la surface augmente lorsque le débit diminue, implique qu'aux faibles débits, une fraction du catalyseur n'est pas mise à profit pour mener la réaction, ce qui

diminue l'efficacité catalytique des plaques supports. En effet, la répartition des flux sur la surface fonctionnalisée est largement dépendante des pertes de charge dans le réacteur. L'introduction du dépôt de butylchitosan sur la microstructure des plaques supports modifie profondément l'hydrodynamique. Les aspérités du dépôt accentuent la distribution non homogène des flux sur la surface, et ce, d'autant plus que les débits sont faibles. De plus, l'addition de chaînes alkyls sur la structure du chitosan augmente significativement son caractère hydrophobe. Les tensions de surfaces entre la matrice et la solution aqueuse doivent être surmontées pour mouiller la surface. Ce phénomène explique, au moins en partie, l'augmentation de production de NADH avec le débit. L'étape limitante de la réaction, sujet du chapitre IV, doit être déterminée pour interpréter pleinement ces observations expérimentales.

2) Recyclage continu

Pour confirmer l'hypothèse quant à l'influence du débit sur la surface occupée par les zones mortes et tenter d'y apporter une solution, l'expérience précédente impliquant la régénération de NADH en microréacteur sera menée en recyclant en continu une fraction de la solution. Le principe du recyclage continu est explicité à la figure III.11.

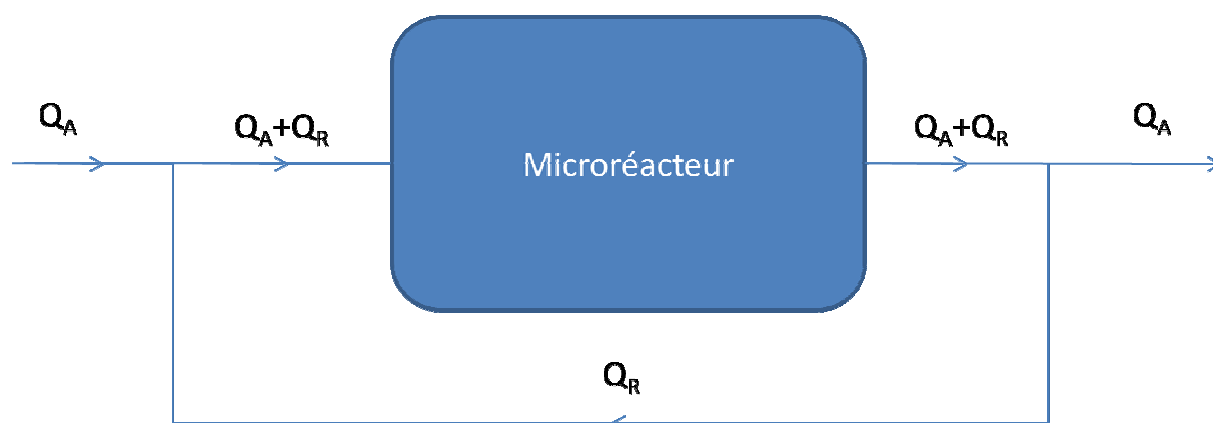


Figure III.11 : Schéma de principe du recyclage continu de la solution à traiter.

Q_A : débit d'alimentation du système ; Q_R : débit de recyclage.

Une partie du flux de sortie est recyclé en entrée du réacteur à l'aide d'une seconde pompe péristaltique. Le rapport Q_R/Q_A , appelé taux de recyclage R , est contrôlé en réglant le débit de cette seconde pompe par rapport à la pompe d'alimentation. Le débit d'alimentation, Q_A , permet de fixer le temps de séjour moyen de la solution dans le réacteur. Le volume de la tuyauterie de la boucle de recyclage est négligeable devant le volume du reste du système (réacteur et tuyauterie d'alimentation et de sortie). Par conséquent, pour un même débit d'alimentation, le temps de séjour moyen de la solution dans le réacteur est identique avec, ou sans recyclage.

L'intérêt de cette méthode est d'augmenter la convection au sein du réacteur *via* l'augmentation du débit « vu » par le catalyseur, sans pour autant diminuer le temps de séjour moyen de la solution dans le réacteur. Plus R est grand, plus le débit au sein du réacteur augmente. La valeur du débit d'alimentation du système, Q_A , est fixée à la valeur précédente où le plus de zones mortes ont été observée, c'est-à-dire $Q_A = 63 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$. La concentration en NADH formé au cours du temps en sortie du système est quantifiée par spectrophotométrie UV pour différents taux de recyclage et la production du système

par unité de temps et de surface fonctionnalisée est calculée. Les résultats sont présentés figure III.12.

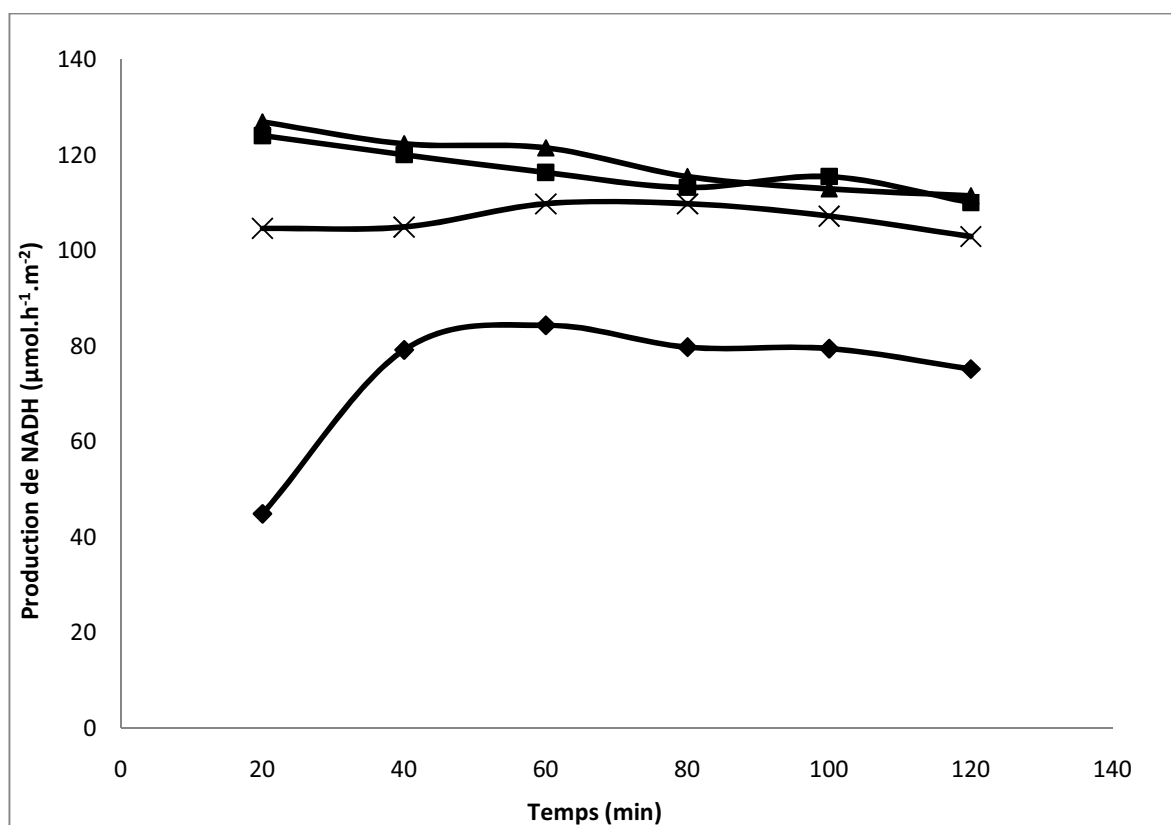


Figure III.12 : Production de NADH au cours du temps en sortie du microréacteur pour différents taux de recyclage. Solution initiale : tampon phosphate pH=7, $[NAD^+]=0,5$ mM, $[HCO_2^-]=0,1$ M, $T=38^\circ\text{C}$. Débit d'alimentation Q_A : $63 \mu\text{l.min}^{-1}$. ♦ : pas de recyclage; ■ R=1; ▲ R=3 ; X R=5.

Le recyclage augmente significativement la conversion. Quel que soit le taux de recyclage, celle-ci augmente de 35% environ par rapport à la même expérience conduite sans recyclage. Cependant, cette augmentation, indépendante de la valeur de R, semble confirmer l'hypothèse émise quant à la présence de zones mortes dans le réacteur fonctionnant aux faibles débits. En effet, dès un taux de recyclage de 1, le débit

au sein du réacteur devient suffisant pour surmonter les tensions de surfaces et exploiter l'ensemble de la matrice d'immobilisation, augmentant ainsi la conversion. En revanche, pour un taux de recyclage supérieur à 1, la conversion reste stable car toute surface de la plaque support est déjà accessible à la solution. Le taux de conversion n'est donc plus gouverné que par le temps de séjour de la solution, fixé par la valeur du débit d'alimentation Q_A .

Cette expérience permet également de tirer des informations quant au mécanisme limitant la conversion. En effet, si celle-ci est indépendante de la convection dans le réacteur, cela implique l'absence de limitation par diffusion externe à la matrice, contrairement à ce que pouvait laisser penser la figure III.10. En effet, la théorie de la couche limite prévoit que l'épaisseur de la couche de diffusion en solution diminue avec l'augmentation de la convection, et donc que le flux diffusif augmente. Or, ce n'est pas le cas. Cela n'exclut pas pour autant une limitation par diffusion interne des réactifs dans le dépôt, indépendamment de la convection. Le mécanisme limitant le procédé sera abordé en détails au Chapitre IV.

VI. Application à la synthèse du L-lactate

L'objectif initial reste la régénération *in situ* du cofacteur NADH lors de synthèse enzymatique. Les différentes études réalisées jusqu'à présent, ont démontré qu'il est possible de réduire NAD^+ en NADH à l'aide de l'enzyme *formate déshydrogénase* immobilisée dans un alkylchitosan. Cependant, la réactivité enzymatique du NADH ainsi formé reste à démontrer. En effet, il est connu que certaines méthodes de régénération, notamment électrochimiques, conduisent à une forme inactive de NADH (Steckhan, 1994). Ce n'est, a priori, pas le cas de la réaction entre NAD^+ et le formate HCOO^- catalysée par la *formate déshydrogénase*, mais l'enzyme étant immobilisée, ces propriétés catalytiques peuvent en être modifiées. Il convient donc de s'en assurer en mettant en œuvre une seconde réaction enzymatique, *in situ* dans le microréacteur lors de la régénération de NADH. Le choix de la réaction modèle utilisée, consommant le NADH formé, doit répondre à un certain nombre de critères :

- ✓ La réaction doit être rapide et totale pour faciliter les analyses
- ✓ L'enzyme impliquée doit être disponible commercialement et stable dans les conditions opératoires employées.
- ✓ La conversion du réactif doit être quantifiable par une technique d'analyse courante (UV, HPLC...)

Une thèse précédente, réalisée au laboratoire, a montré que la synthèse chirale du L-lactate, à partir du pyruvate, catalysée par l'enzyme *L-lactate déshydrogénase* (LDH) est rapide et totale (Kane, 2005). Cette réaction satisfait l'ensemble de ces critères. Elle est représentée figure III.13.

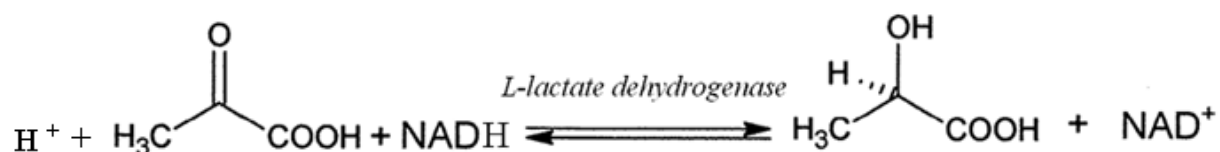


Figure III.13 : Réaction de synthèse enzymatique NADH-dépendante du L-lactate à partir du pyruvate, catalysée par L-lactate déshydrogénase.

1) Protocole d'analyse

L'avancement de la réaction est suivi par HPLC couplé à un détecteur UV, à l'aide d'une colonne échangeuse de protons (*Polymer Laboratories*, PL Hi-Plex H, 8 μm 300x7,7 mm). Les conditions d'élutions, optimisées pour permettre la séparation totale de tous les composés impliqués, sont les suivantes :

- ✓ éluant = H_2SO_4 (5 mmol.L^{-1})
- ✓ débit = 0,6 mL.min^{-1}
- ✓ pression = 38 bars
- ✓ température de la colonne = 35°C,
- ✓ longueur d'onde du détecteur $\lambda = 210 \text{ nm}$

La quantification de la conversion du pyruvate est réalisée par étalonnage externe, à 210 nm. Le coefficient d'extinction molaire du substrat, le pyruvate, est environ dix fois supérieur à celui du produit, le L-lactate. Le bilan de matière se fera donc par rapport au pyruvate pour une plus grande précision sur les résultats. Toutefois, la présence de L-lactate est systématiquement vérifiée *via* la présence d'un pic de faible intensité devant celui du substrat, au temps de rétention du L-lactate (14 min).

2) Résultats et interprétations

Le schéma réactionnel complet est présenté figure III.14.

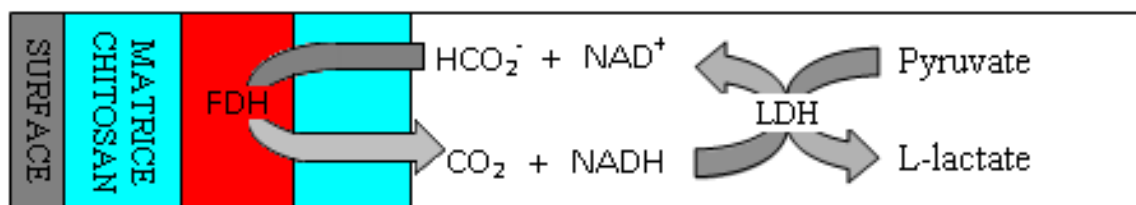


Figure III.14 : Schéma réactionnel de la synthèse du L-lactate à partir du pyruvate catalysée par une L-lactate déshydrogénase couplé au système de régénération enzymatique de NADH par la formate déshydrogénase immobilisée.

Une solution de tampon phosphate contenant le cofacteur oxydé (NAD^+), le substrat de régénération (HCOO^-), le substrat à transformer (pyruvate) et l'enzyme de la réaction modèle (*L-lactate déshydrogénase*) est introduite dans le microréacteur contenant la matrice d'immobilisation de la *formate déshydrogénase*, préalablement lavée de ces enzymes non retenues. Le réacteur est mis en régime hydrodynamique et la solution est recueillie en sortie du réacteur. Un prélèvement est

utilisé pour l'analyse HPLC et le reste de la solution est réintroduit en entrée du réacteur. Cette technique, appelée recyclage discontinu, permet d'améliorer la conversion du pyruvate en simulant la mise en série de plusieurs microréacteurs. Au total, chaque expérience consiste en trois passages dans le réacteur et est réalisée pour deux concentrations initiales distinctes en pyruvate. Les résultats en termes de conversion globale du pyruvate sont consignés dans le tableau III.15.

| [pyruvate] ^o /mmol.L ⁻¹ | Conversion globale du pyruvate (%) | | |
|---|------------------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| | 1 ^{er} passage | 2 nd passage | 3 ^{ème} passage |
| 1 | 16 | 26 | 33 |
| 0,5 | 27 | 44 | 59 |

Tableau III.15: Conversion du pyruvate en L-lactate pour 3 passages dans le microréacteur.
Solution initiale : tampon phosphate pH=7, [NAD⁺]=0,5 mmol.L⁻¹, [HCO₂⁻]=0,1mol.L⁻¹, [LDH]=5 U.ml⁻¹,
T=38°C, débit de 63 µl.min⁻¹.

La réaction de transformation du pyruvate en L-lactate a bien lieu dans ces conditions, ce qui implique la formation de NADH enzymatiquement actif. Après chacun des passages de la solution dans le microréacteur, l'absorbance de la solution à 340 nm est mesurée et dénote une absence totale de NADH en solution. Cela implique donc qu'il n'y a pas d'accumulation de cofacteur biologiquement inactif et que l'ensemble du NADH formé au cours de la réaction est consommé par la synthèse modèle. Le système de régénération *in situ* de NADH semble donc viable.

Il est également intéressant de mettre en parallèle les taux de conversion du pyruvate et les taux de conversion de NAD^+ en NADH en absence de réaction modèle. Dans les mêmes conditions hydrodynamiques, de température et de concentrations initiales (NAD^+ , HCOO^-), l'ajout de pyruvate, en quantité stœchiométrique par rapport à NAD^+ , permet d'atteindre dès le premier passage, une conversion de 27% en L-lactate alors que dans les mêmes conditions expérimentales, seul 14% de NAD^+ étaient convertis en NADH. La réaction modèle se faisant mole à mole entre le NADH et le pyruvate, ceci implique que l'ajout d'un second système enzymatique consommant le NADH au fur et à mesure de sa formation, favorise sa régénération.

VII. Conclusion

La quantité d'enzyme à introduire dans la matrice d'immobilisation de butylchitosan, conduisant à la meilleure activité catalytique est de 24 U.g^{-1} . Moins de catalyseur implique une baisse d'activité alors qu'en ajouter davantage n'est pas utile car l'enzyme n'est pas retenue. A 24 U.g^{-1} , le phénomène de relargage est présent, puisque environ 20 % de l'enzyme n'est que peu ou pas retenue par la matrice.

L'étude de la durée de vie du procédé employant cette technique d'immobilisation de la *formate déshydrogénase*, a montré que le catalyseur reste actif après 3 semaines de fonctionnement. De plus, l'activité reste supérieure à 50% de sa valeur initiale pendant 2 semaines. Comparée aux données disponibles dans la littérature concernant l'immobilisation de la *formate déshydrogénase*, cette durée de vie constitue une performance notable.

L'étude en mode de fonctionnement continu indique clairement que la conversion de NAD^+ en NADH est à corréluer au temps de séjour de la solution dans le réacteur, et donc aux débits. Cependant, l'apparition de zones sèches sur les plaques fonctionnalisées est observée et implique l'existence de volume mort dans le réacteur fonctionnant à faible débit ($\leq 127 \mu\text{L.min}^{-1}$).

Le recyclage continu d'une fraction de la solution permet de résoudre ce problème en augmentant la convection au sein du réacteur sans pour autant diminuer le temps de séjour moyen de la solution. Les zones mortes disparaissent mais, quelque soit le taux de recyclage, la conversion reste identique. Une limitation de la conversion par diffusion externe à la matrice semble donc à exclure des possibles mécanismes limitants. Au prochain chapitre, la mise en équation des phénomènes de transport de matière permettra de mettre en évidence ce mécanisme.

Enfin, le système de régénération *in situ* de NADH a été appliqué avec succès à une synthèse chirale modèle le consommant. La conversion obtenue du pyruvate en L-lactate, traduit une augmentation de production de NADH par rapport à l'absence de réaction de synthèse. De plus, tout le NADH produit l'est uniquement sous sa forme enzymatiquement active.

References

Groger, H., Hummel, W., Buchholz, S., Drauz, K., Nguyen, T., Husken, H., Abokitse, K., "Practical asymmetric enzymatic reduction through discovery of a dehydrogenase-compatible biphasic reaction media", *Org. Lett.*, vol. 5 (2003) 173-176.

Kane, C., "Conception et réalisation de microréacteurs électrochimiques – Application à la régénération électro enzymatique de NADH et potentialités en synthèse" , thèse soutenue au Laboratoire de Génie Chimique (2005).

Klotzbach, T., Watt, M., Ansari, Y., Minteer, S., "Effects of hydrophobic modification of chitosan and Nafion on transport properties, ion-exchange capacities, and enzyme immobilization", *Journal of Membrane Science*, vol. 282 (2006) 276-283.

Klotzbach, T., Watt, M., Ansari, Y., Minteer, S., "Improving the microenvironment for enzyme immobilization at electrodes by hydrophobically modifying chitosan and Nafion polymers", *Journal of Membrane Science*, vol. 311 (2008) 81-88.

Roche, J., Tzedakis, T., Groenen Serrano, K., Reynes, O., « Nouveau procédé de régénération enzymatique continue de NADH et de détection de NAD^+ et système pour sa mise en œuvre », à paraître, n° de demande 1055209, n° de soumission 1000083253.

Steckhan, E., "Electroenzymatic synthesis", *Top. Curr. Chem.*, vol. 170 (1994) 83-111.

Chapitre IV : Modélisation

SOMMAIRE

| | |
|---|------------|
| I. Introduction | 146 |
| II. Modélisation physico-chimique de la génération de NADH | 147 |
| 1) Equations de continuité | 150 |
| 2) Conditions aux limites | 153 |
| 3) Présentation du logiciel | 154 |
| III. Résultats et interprétations | 156 |
| 1) Epaisseur de couche | 156 |
| 2) Paramètres..... | 157 |
| 3) Simulations | 158 |
| IV. Conclusion | 163 |
| Références | 164 |

I. Introduction

La théorie de la catalyse hétérogène, prévoit trois mécanismes, énoncés au Chapitre III, susceptibles de limiter l'avancement de la réaction : la diffusion des réactifs en solution (externe), la diffusion dans le polymère (interne) ou la vitesse de réaction. Si la diffusion externe ne semble pas limitante (cf Ch III, paragraphe V.2), seul un modèle numérique tenant compte de la géométrie du réacteur et du polymère, des phénomènes de transfert de matière en son sein et de la loi de vitesse de la réaction catalysée par la FDH, permet de déterminer quel est la part de chaque étape dans la limitation du procédé.

Après avoir défini la géométrie et les frontières du système, les équations de continuité sont établies *via* un bilan matière en réactif NAD^+ , tenant compte des différents mécanismes de transfert, présents dans les différents sous domaines.

Le modèle est ensuite implémenté dans un logiciel de simulation et de résolution numérique des équations différentielles partielles par la méthode des éléments finis. L'adéquation entre les simulations et les résultats expérimentaux, ainsi que la pertinence des hypothèses sur lesquelles est construit le modèle mathématique, sont discutés et les paramètres déterminés par le modèle sont comparés à des exemples issus de la littérature.

II. Modélisation physico-chimique de la génération de NADH

L'élaboration d'un modèle mathématique s'appuie sur un certain nombre d'hypothèses et sur un bilan de matière en réactif NAD^+ dans un élément de volume, pris dans chacun des domaines du modèle, en régime stationnaire. Les axes et l'origine du repère cartésien orthogonal utilisé par la suite sont représentés sur la figure IV.1

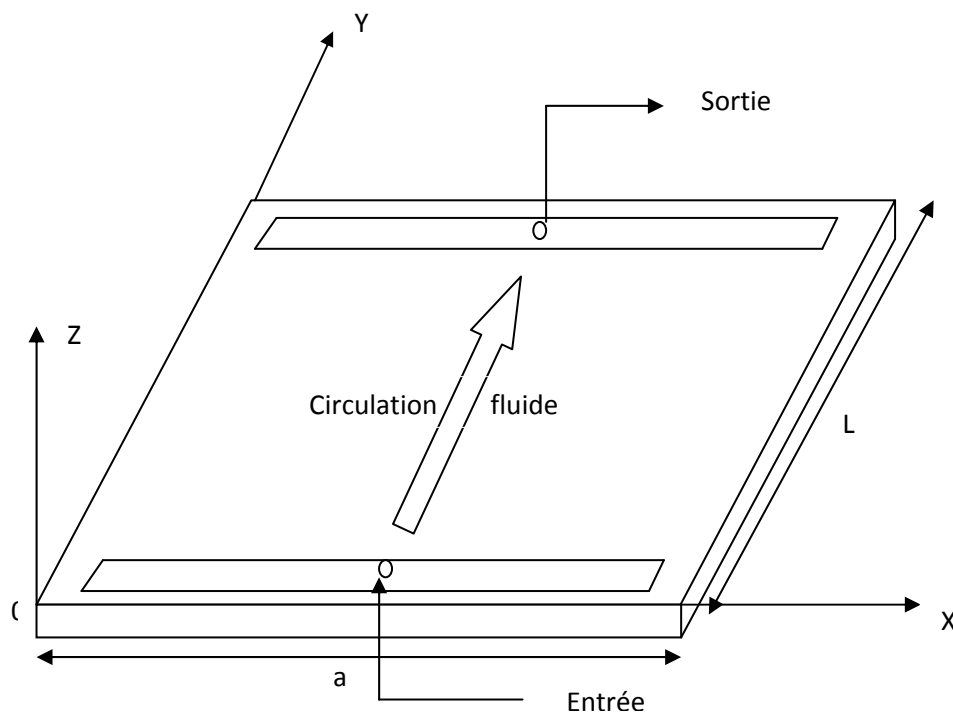


Figure IV.1 : Schéma de la géométrie du réacteur utilisée pour le modèle

Les équations différentielles partielles (EDP) et les conditions aux limites définies par la suite sont valables dans le cadre d'hypothèses, résumées ci-dessous :

✓ Le réacteur filtre presse utilisé est considéré comme un réacteur piston ; par conséquent, la concentration varie selon le sens de circulation du fluide (Oy), entre l'entrée et la sortie du réacteur.

✓ Les débits au sein du réacteur sont uniformes selon x ; par conséquent, la concentration en réactif est constante selon (Ox).

✓ Il n'y a pas de turbulences au voisinage des aspérités de la matrice de butylchitosan.

✓ Le coefficient de partage du réactif NAD^+ à l'interface polymère/solution est pris égal à 1. Il n'y a donc pas de discontinuité du profil de concentration selon z , à cette interface.

✓ Le coefficient de diffusion du produit de réaction, $NADH$, est considéré égal au coefficient de diffusion du réactif NAD^+ , en solution et dans le polymère.

✓ L'enzyme est uniformément répartie dans le volume de la 1^{ère} couche de butylchitosan et la quantité d'enzyme dans la couche supérieure est négligeable.

✓ Les paramètres de la loi cinétique du mécanisme bi-bi ordonné de l'enzyme *formate déshydrogénase* (cf Chapitre II, III.2), déterminés en milieu homogène, sont supposés inchangés après immobilisation.

Le fluide à traiter circule selon l'axe y . La matrice d'immobilisation est déposée sur le plan (Oxy) et le cofacteur diffuse de la solution vers le dépôt, puis au sein du dépôt, selon l'axe z . Selon l'axe x , l'hypothèse d'un profil de concentration uniforme est faite. Par conséquent, la modélisation sera menée en deux dimensions, dans le plan (Oyz). La géométrie, à l'échelle, tenant compte des deux plaques supports montées en configuration filtre-presse, telle qu'apparaissant dans le modèle, est représentée figure IV.2.

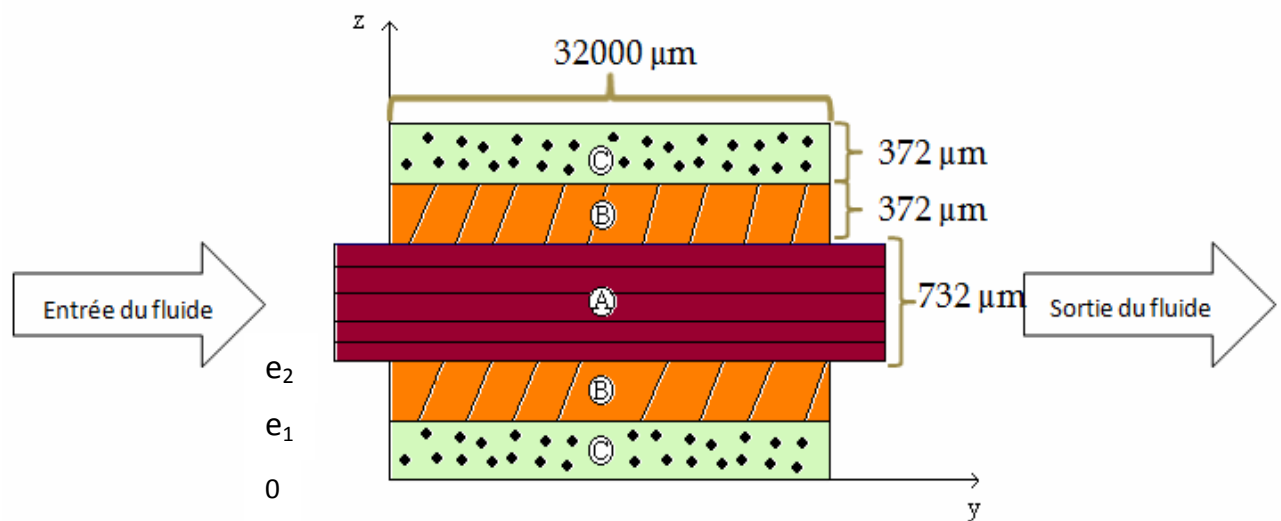


Figure IV.2 : Géométrie du modèle à l'échelle. Zone A : fluide circulant entre les deux dépôts.
Zone B : Membrane de butylchitosan. Zone C : Matrice d'immobilisation de la FDH en butylchitosan.

La géométrie est divisée en trois sous domaines :

✓ La zone A correspond à l'espace compris entre les deux plaques supports fonctionnalisées, où circule le fluide. Dans cette zone, le fluide adopte un profil de vitesse parabolique selon z . Le comportement du fluide sera intégré dans le modèle en considérant l'équation de Navier-Stokes d'un fluide Newtonien incompressible.

✓ La zone B, d'épaisseur $(e_2 - e_1)$, correspond à la couche supérieure de butylchitosan. La convection est considérée comme nulle dans ce domaine. L'enzyme n'étant présente que dans la couche inférieure, cette zone ne sera le siège que d'un phénomène de diffusion des espèces réactives et des produits.

✓ La zone C correspond à la première couche de matrice, d'épaisseur e_1 , dans laquelle est immobilisée la FDH. On fait l'hypothèse que l'enzyme est répartie uniformément dans le volume de cette couche. Cette zone sera le siège de la réaction enzymatique couplée à un phénomène de diffusion.

1) Equations de continuité

Les équations décrivant les variations de la concentration en réactif NAD^+ dans l'espace, sont issues des bilans matière dans un élément de volume quelconque pris entre les deux plaques supports décrit dans le paragraphe précédent (équation IV.1).

$$(\text{Accumulation}) = (\text{Flux d'entrée}) - (\text{Flux de sortie}) - (\text{Flux de réaction}) \quad \text{IV.1}$$

Le régime stationnaire est atteint (cf Ch. III, paragraphe V.1), le terme d'accumulation est nul et, par conséquent, le bilan matière s'écrit (équation IV.2) :

$$\text{div} \vec{J}_i - r_i = 0 \quad \text{IV.2}$$

J_i représente la densité de flux de transport de NAD^+ et r la vitesse de consommation de NAD^+ par la réaction enzymatique.

La densité de flux de matière de NAD^+ dépend, en l'espèce, de deux phénomènes de transport, la diffusion (interne ou externe) et la convection forcée. La densité de flux de transfert par diffusion, est issue de la 1^{ère} loi de Fick :

$$\vec{J}_{diff} = -D_i \nabla C_i \quad \text{IV.3}$$

La convection totale résulte des convections naturelle et forcée. La convection naturelle est issue d'une différence de masse volumique dans le fluide. Le réacteur microstructuré permet de thermostatier efficacement le volume réactionnel et d'éviter les points chauds, par conséquent, la convection naturelle est négligeable. La convection forcée résulte de la mise en mouvement du fluide par la pompe et le flux convectif s'écrit (équation IV.4) :

$$\vec{J}_{conv} = \vec{u} C_i \quad \text{IV.4}$$

La densité de flux total est donc la somme de la densité de flux de diffusion, issue de la 1^{ère} loi de Fick, et de la densité de flux convectif selon l'équation IV.5 :

$$\vec{J}_i = -D_i \nabla C_i + \vec{u} C_i \quad \text{IV.5}$$

Avec C_i la concentration du réactif NAD^+ , D_i le coefficient de diffusion de NAD^+ dans le milieu considéré, et u la vitesse du fluide.

Si l'on remplace la valeur de la densité de flux dans l'équation IV.2, on obtient l'équation générale de continuité du système (équation IV.6)

$$D_i \left(\frac{\partial^2 C_i}{\partial z^2} \right) - u \frac{\partial C_i}{\partial z} - r_i = 0 \quad \text{IV.6}$$

Cette équation peut être appliquée et simplifiée dans chaque sous domaine :

- ✓ Zone A : En absence d'enzyme, le terme correspondant à la réaction enzymatique devient nul.

$$D_i \left(\frac{\partial^2 C_i}{\partial z^2} \right) - u \frac{\partial C_i}{\partial z} = 0 \quad \text{IV.7}$$

Avec D_i , le coefficient de diffusion de NAD^+ en solution dans le tampon phosphate.

- ✓ Zone B : Le transport de matière est purement diffusionnel, le terme convectif devient nul. La diffusion a lieu dans la matrice. De même, en absence d'enzymes, le terme de réaction est nul.

$$D_a \left(\frac{\partial^2 C_i}{\partial z^2} \right) = 0 \quad \text{IV.8}$$

Avec D_a , le coefficient de diffusion apparent de NAD^+ dans le polymère.

✓ Zone C : La convection est nulle et la réaction a lieu en présence d'enzymes.

$$D_a \left(\frac{\partial^2 C_i}{\partial z^2} \right) - r_i = 0 \quad \text{IV.9}$$

Les valeurs du vecteur vitesse \vec{u} dans la zone A sont modélisées grâce à l'équation de Navier-Stokes appliquée à un fluide Newtonien incompressible (équation IV.10).

$$\rho \left[\frac{\partial \vec{u}}{\partial t} + (\vec{u} \nabla) \vec{u} \right] = -\nabla \vec{p} + \mu \nabla^2 \vec{u} + F_v \quad \text{IV.10}$$

Où ρ est la masse volumique du fluide, p la pression, μ la viscosité du fluide et F_v la somme des forces extérieures par unité de volume. En pratique, le modèle a comme paramètres d'entrée la valeur du débit ou la vitesse moyenne du fluide, la viscosité et la masse volumique, la perte de charge entre l'entrée et la sortie et la distance entre les plaques.

2) Conditions aux limites

La surface des plaques supports n'étant le siège d'aucune réaction, les conditions aux limites à chaque interface avec la surface du réacteur sont définies

comme une densité de flux de transport nulle. Cette condition de Neumann s'écrit, par exemple pour la frontière entre la zone C et la plaque support :

$$-D\left(\frac{\partial C_i}{\partial z}\right)_{z=0} = 0 \quad \text{IV.11}$$

Les conditions aux limites entre les 3 zones définies précédemment reposent sur l'écriture de l'égalité des flux à une distance dz , de part et d'autre de l'interface. La condition à la frontière des domaines A et B s'écrit :

$$D_a \frac{\partial C_i}{\partial z} \Big|_{z=e_2-dz} = D \frac{\partial C_i}{\partial z} \Big|_{z=e_2+dz} + uC_i \quad \text{IV.12}$$

De même, entre les domaines B et C :

$$D_a \frac{\partial C_i}{\partial z} \Big|_{z=e_1-dz} = D_a \frac{\partial C_i}{\partial z} \Big|_{z=e_1+dz} \quad \text{IV.13}$$

Enfin, en $y=0$, pour tout z , la concentration C_i en réactif NAD^+ est prise égale à la concentration d'entrée $C^0=0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$.

3) Présentation du logiciel

La géométrie du réacteur, les équations aux dérivées partielles (EDP) décrivant le système et les conditions aux limites sont ensuite implémentées dans un modèle réalisé à l'aide du logiciel COMSOL® Multiphysics.

COMSOL[®] est un logiciel de résolution des EDP par la méthode des éléments finis, pouvant fonctionner en 2D ou en 3D, en régime stationnaire ou transitoire. De nombreux modèles de phénomènes physiques, allant du transfert de chaleur ou de transport de matière, aux réactions chimiques en passant par l'acoustique ou la mécanique, sont prédéfinis et fournis avec le logiciel. Ces modèles physiques conventionnels sont cependant aisément modifiables et il est possible de les coupler entre eux pour s'adapter aux différentes problématiques. La démarche générale consiste d'abord à tracer la géométrie du système *via* une interface graphique, puis à définir l'ensemble des sous domaines. A chaque sous domaine est associé un ou plusieurs modèles physiques, ceci sont paramétrés et les conditions aux limites sont ajoutées.

Le maillage du système est également paramétrable, indépendamment, dans chaque sous domaine. Les mailles peuvent être triangulaires, tétraédriques ou rectangulaires et leurs tailles peuvent être modifiées localement ou globalement. De manière générale, le maillage est choisi empiriquement pour assurer la convergence des équations et un maillage trop hétérogène du système conduit souvent à des problèmes de divergence.

III. Résultats et interprétations

Au niveau de la géométrie, si les dimensions du réacteur sont connues, l'épaisseur de chaque couche de butylchitosan doit être déterminée avant de lancer les simulations.

1) Epaisseur de couche

Une couche est donc réalisée dans une cuve transparente dans les conditions de dépôt définies au chapitre II. La masse précise de butylchitosan est déterminée et l'épaisseur de la couche résultante est mesurée à l'aide d'une binoculaire et d'un traitement logiciel permettant d'associer une échelle à la photo issue du microscope. L'expérience est renouvelée trois fois pour s'assurer de la reproductibilité. Le volume de la matrice peut être calculé, et connaissant la masse de polymère, la masse volumique du butylchitosan déposé dans les conditions spécifiques de cette étude est déterminée à 81 mg.cm^{-3} .

Un phénomène de gonflement du polymère est susceptible d'intervenir une fois la matrice en contact avec une solution aqueuse. L'expérience précédente est donc renouvelée en mesurant l'épaisseur de dépôts immergés préalablement dans un tampon phosphate pendant 5h. Les résultats montrent une absence de gonflement mesurable une fois le dépôt hydraté.

La masse volumique est maintenant connue et l'épaisseur moyenne d'une couche de polymère peut être déterminée par pesée.

2) Paramètres

Les paramètres utilisés lors des simulations sont résumés dans le tableau suivant (Tableau IV.1).

| Paramètres | Significations | Valeurs |
|------------|--|--|
| $e_1; e_2$ | Epaisseur de la matrice | 376.10^{-6} m |
| L | Longueur du réacteur | 0,032 m |
| d | Distance entre les plaques | $2,22.10^{-3} \text{ m}$ |
| D_i | Coefficient de diffusion NAD^+ en solution | $2,4.10^{-10} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ |
| Q | Débit de circulation | $1,05.10^{-9} \text{ m}^3.\text{s}^{-1}$ |
| C_0 | Concentration d'entrée de NAD^+ | $0,5 \text{ mol.m}^{-3}$ |
| S | Concentration en formate HCOO^- | 100 mol.m^{-3} |
| V_m | Vitesse enzymatique maximum | $8,8.10^{-3} \text{ mol.m}^{-3}.\text{s}^{-1}$ |
| K_{ia} | Constante de dissociation de ES_1S_2 | $0,2 \text{ mol.m}^{-3}$ |
| K_{m1} | Constante de Michaelis de NAD^+ | $8,23.10^{-2} \text{ mol.m}^{-3}$ |
| K_{m2} | Constante de Michaelis du formate HCOO^- | $9,2 \text{ mol.m}^{-3}$ |
| η | Viscosité dynamique | 1.10^{-3} Pa.s |

Tableau IV.1 : Paramètres du modèle

3) Simulations

Afin d'initialiser les simulations, la valeur du coefficient de diffusion apparent du cofacteur dans la matrice est fixé arbitrairement à environ 100 fois moins que la valeur du coefficient de diffusion en solution ($D=2,4.10^{-10} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$). Les conditions de débits ($63 \mu\text{L}.\text{min}^{-1}$), de concentration d'entrée en NAD^+ ($0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$) et en formate ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) et de température (38°C) sont fixées par rapport aux conditions expérimentales utilisées lors du chapitre III. La figure IV.3 indique le profil de concentration en réactif NAD^+ au sein du réacteur, calculé à l'aide du modèle.

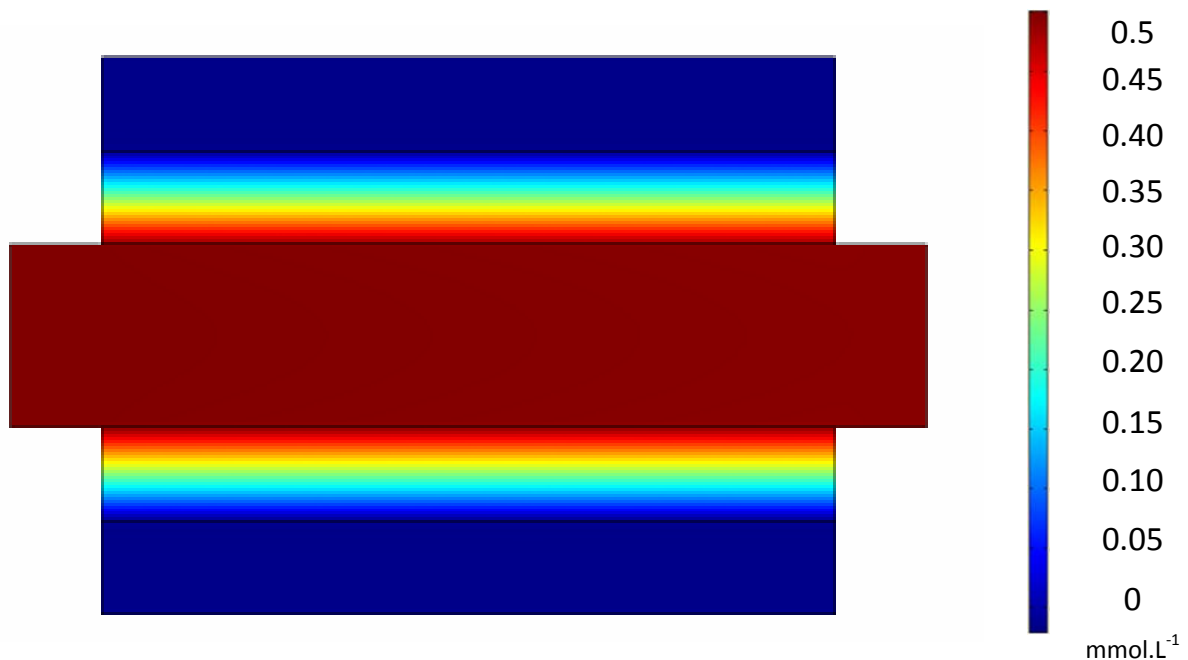


Figure IV.3 : Profil simulé de concentration en réactif NAD^+ au sein du réacteur $[\text{NAD}^+]^0=0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, $[\text{HCO}_2^-]^0=0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $T=38^\circ\text{C}$. Débit d'alimentation $Q_A: 0,063 \text{ ml.min}^{-1}$. Coefficient de diffusion apparent de NAD^+ dans le polymère $D_a=2.10^{-12} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$.

Dans ces conditions de simulation, la conversion de NAD^+ calculée en sortie du réacteur est quasi nulle ($<1\%$). Expérimentalement, dans ces mêmes conditions, la

conversion en sortie du réacteur est de 14%, en absence de réaction enzymatique modèle consommant NADH. D'après la figure IV.3, la diffusion interne du réactif dans la matrice d'immobilisation est trop peu efficace pour garantir un avancement à la réaction. Il semble donc que le coefficient de diffusion apparent soit largement sous-estimé. Une simulation supplémentaire est donc réalisée en prenant une valeur de coefficient de diffusion très proche du coefficient de diffusion en solution. Les résultats sont indiqués figure IV.4.

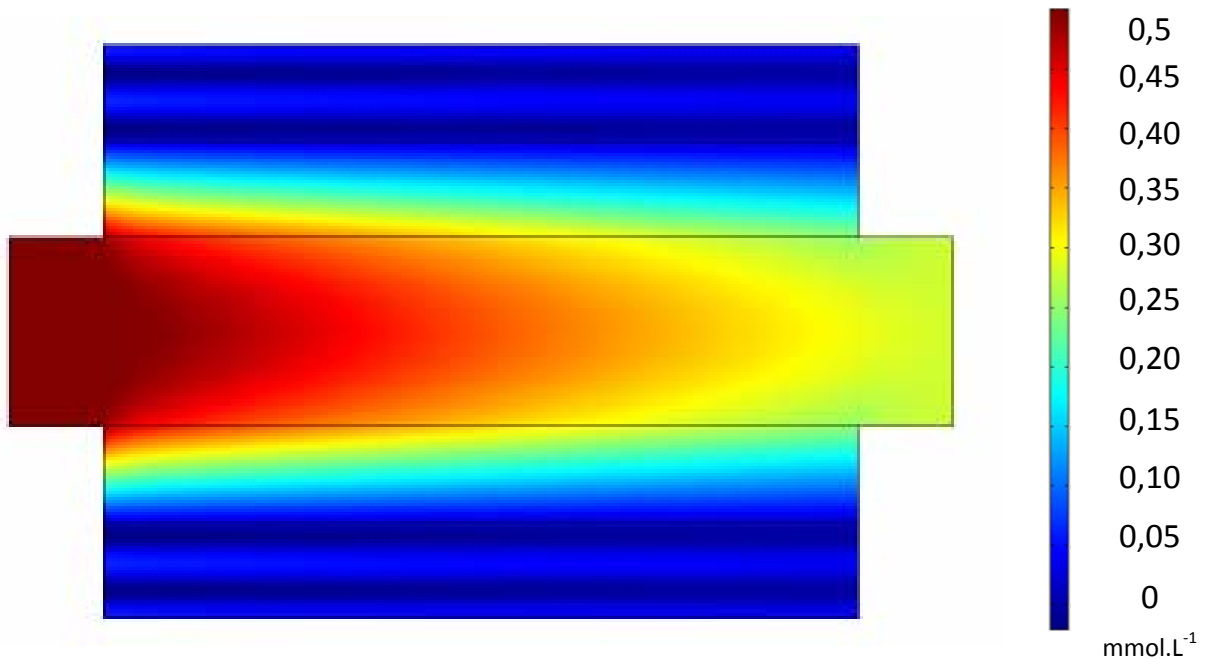


Figure IV.4 : Profil simulé de concentration en réactif NAD^+ au sein du réacteur $[\text{NAD}^+]^0 = 0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, $[\text{HCO}_2^-]^0 = 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $T = 38^\circ\text{C}$. Débit d'alimentation $Q_A : 0,063 \text{ ml.min}^{-1}$. Coefficient de diffusion apparent de NAD^+ dans le polymère $D_a = 2,0.10^{-10} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$.

La conversion de NAD^+ calculée en sortie de réacteur atteint cette fois 44%, alors qu'expérimentalement, elle n'est que de 14%. Avec cette valeur de coefficient de diffusion apparent, un gradient de concentration en solution, selon l'axe z , est visible sur la simulation. Une limitation de l'avancement par diffusion externe s'ajoute à la

limitation par diffusion interne pour conduire à un régime mixte diffusion interne/diffusion externe.

Dès lors, il semble possible de trouver une valeur de coefficient de diffusion apparent, pris entre ces deux cas extrêmes, qui conduise à une meilleure adéquation entre simulation et résultats expérimentaux. Une série de simulations est réalisée en faisant varier la valeur de D_a , jusqu'à trouver, de proche en proche, la meilleure adéquation. Celle-ci est atteinte pour une valeur de $2,1 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. La figure IV.5 représente le profil de concentration obtenue lors de cette simulation.

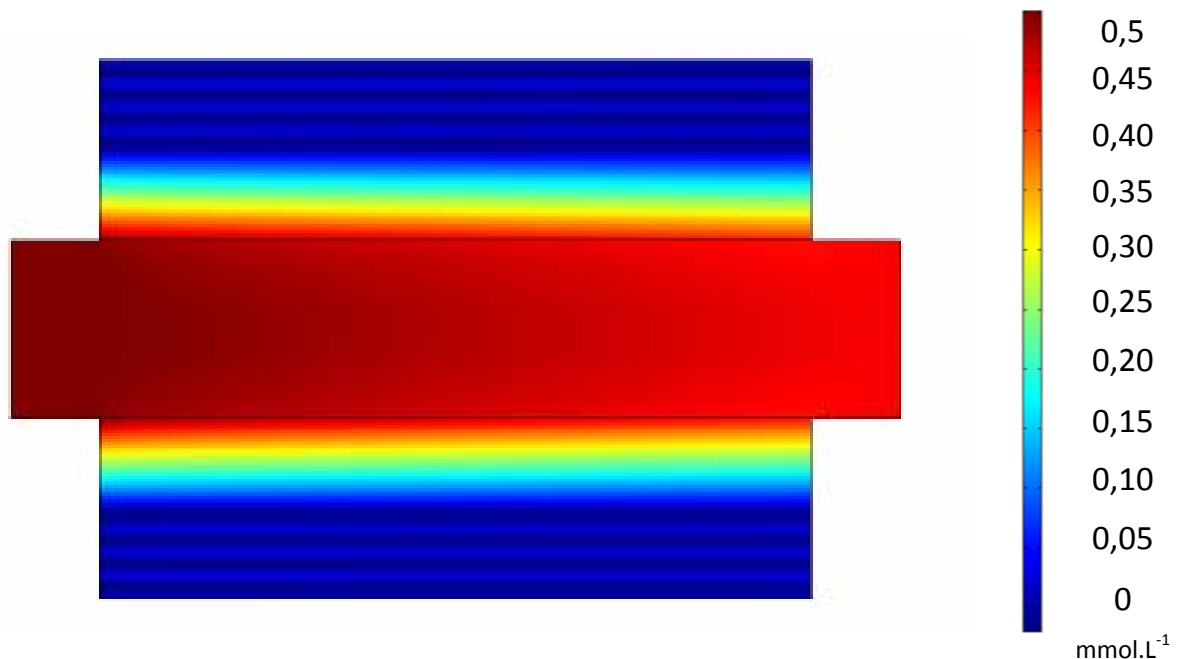


Figure IV.5 : Profil simulé de concentration en réactif NAD^+ au sein du réacteur $[\text{NAD}^+]^0 = 0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, $[\text{HCO}_2^-]^0 = 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $T = 38^\circ\text{C}$. Débit d'alimentation $Q_A : 0,063 \text{ ml.min}^{-1}$. Coefficient de diffusion apparent de NAD^+ dans le polymère $D_a = 2,1 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

La concentration en réactif NAD^+ dans le domaine C, lieu de la réaction, est quasi nulle. La réaction est donc rapide devant le transfert de matière, et le procédé n'est donc pas limité par la réaction.

Le coefficient de diffusion apparent associé à cette simulation est environ 10 fois inférieur au coefficient de diffusion de NAD^+ en solution. Dans ces conditions, le gradient de diffusion interne, selon z , est grand devant le gradient de diffusion externe, pour toute valeur de y . Il semble donc que le frein diffusionnel dans le polymère soit grand devant le frein diffusionnel en solution.

La valeur de D_a obtenue peut être mise en perspective par la bibliographie. Si la valeur de coefficient de diffusion apparent de NAD^+ dans le butylchitosan n'est pas directement documentée, sa valeur dans d'autres matrices d'immobilisation enzymatique l'est. Une thèse réalisée au laboratoire (Gros, 1996) s'est intéressé à la diffusion de cofacteur NAD^+ à travers des films de polypyrrole électrogénérés dans différentes conditions. Un modèle, développé par l'auteur, permet de prévoir la valeur approximative du coefficient de diffusion d'une espèce, en fonction de sa taille et de la perméabilité du polymère. Ce modèle prévoit une valeur de D_a de $8 \cdot 10^{-15} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. En pratique, aucun phénomène de diffusion du cofacteur n'a lieu, quelque soit la perméabilité du polymère. De même, Lorenzo *et al.* ont calculé le coefficient de diffusion apparent de NAD^+ dans une SAM (*self assembled monolayer*) composé de 3,4 dihydroxybenaldéhyde et de 4-aminopyridine fortement adsorbés sur une électrode de platine. Un phénomène de diffusion est cette fois bien visible expérimentalement et la valeur de D_a du cofacteur calculé est de $1,8 \cdot 10^{-15} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, à la fois pour la forme oxydé et pour la forme réduite.

Si le modèle est basé sur des hypothèses discutables, comme la répartition uniforme de l'enzyme dans la première couche de butylchitosan, l'ordre de grandeur de D_a obtenu, de $10^{-11} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, semble important comparé aux valeurs obtenues dans d'autres matrices d'immobilisation. La porosité très importante de cette matrice, traduit par la faible masse volumique du polymère ($81 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$), semble permettre une diffusion efficace d'une molécule de taille importante telle que NAD^+ .

Le choix de conserver les paramètres cinétiques de l'enzyme en solution, une fois celle-ci immobilisée, peut également être remis en question. Dans le cadre de réactions enzymatiques hétérogènes, il est souvent délicat de décorrélérer l'influence du transport de matière de l'influence de la vitesse de réaction. La nature de la technique d'immobilisation justifie le choix de cette hypothèse. En effet, la rétention de la FDH par inclusion de l'enzyme dans un polymère, repose sur des interactions essentiellement stériques. L'absence de liaisons covalentes et les conditions « douces » d'immobilisation, explique le choix qui a été fait de conserver les paramètres cinétiques de l'enzyme inchangés, et de faire varier les conditions du transport de matière lors des simulations.

Néanmoins, la tendance des simulations va clairement dans le sens d'une limitation du procédé par la diffusion du cofacteur NAD^+ dans le polymère.

IV. Conclusion

Un modèle mathématique, décrivant la mise en œuvre de la régénération enzymatique de NADH dans le réacteur filtre-presse, basé sur un bilan matière en cofacteur NAD^+ a été développé. La géométrie, les équations différentielles partielles et les conditions aux limites ont ensuite été implémentés dans un logiciel de simulation permettant la résolution des EDP par la méthode des éléments finis. Une valeur du coefficient de diffusion de NAD^+ dans le chitosan permettant de faire coïncider les conversions expérimentales et simulées, a été obtenue avec le modèle. Celle-ci est environ 10 fois inférieure à la valeur du coefficient de diffusion en solution, et apparaît importante comparée aux coefficients de diffusion apparents dans d'autres matrices d'immobilisation enzymatique. La porosité élevée du polymère permet une diffusion aisée d'une molécule telle que NADH. Néanmoins, le profil de concentration en cofacteur simulé avec cette valeur de D_a , montre la présence d'un gradient de concentration dans la matrice, important devant le gradient en solution. Si les hypothèses sur lesquelles est construit le modèle peuvent être discutées, toutes les simulations conduisent à une limitation du procédé par diffusion interne du cofacteur dans la matrice d'immobilisation, malgré une valeur de coefficient de diffusion apparent élevée.

Références

Damian, A., Omanovic, S., "Electrochemical reduction of NAD^+ on a polycrystalline gold electrode", *Journal of Molecular Catalysis*, vol. 253 (2006) 222-233.

Gros, P., thèse soutenu au LGC, "Conception et modélisation d'électrodes modifiées enzyme/polypyrrole pour des procédés d'électrosynthèse biocatalysée", (1996).

Lorenzo, E., Sanchez, L., Pariente, F., Tirado, J., Abruna, H., "Thermodynamics and kinetics of adsorption and electrocatalysis of NADH oxidation with self-assembling quinine derivative", *Analytica Chimica Acta*, vol. 309 (1995) 79-88.

Schmakel, C., Santhanam, K., Elving, P., "Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+) and related compounds. Electrochemical redox pattern and allied chemical behavior", *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 97 (1975) 5083-5092.

Conclusion

Conclusion et perspectives

L'objectif des études présentées dans ce mémoire était double. D'une part, il s'agissait de mettre au point une technique d'immobilisation viable pour une enzyme qui présente une sensibilité physico-chimique importante, la *formate déshydrogénase*. D'autre part, ce catalyseur confiné devait pouvoir être mis en œuvre en continu dans un réacteur filtre presse micro-structuré pour régénérer *in situ* le cofacteur NADH lors de synthèses enzymatiques.

Plusieurs techniques d'immobilisation sur substrat métallique, retenues à l'issue de l'étude bibliographique pour leurs conditions de mise en œuvre « douces », ont été testées. L'adsorption de la protéine directement sur une surface d'or conduit à un support faiblement fonctionnalisé par l'enzyme, et ce, quelque soit l'état de la surface. L'inclusion de l'enzyme dans une matrice de Nafion® modifié par des sels d'alkyl-ammonium ou d'alkyl-phosphonium pose le problème de la stabilité mécanique des dépôts résultants en solution, ou de la désactivation par le solvant utilisé pour mettre en suspension le polymère. En revanche, une matrice de chitosan modifié par des chaînes alkyls de quatre carbones, couplée à une structure couche par couche, permet la rétention et le maintien des propriétés catalytiques de l'enzyme. De plus, le cofacteur pyridinique NAD^+ , est capable de diffuser à travers cette structure, pour atteindre le centre actif de l'enzyme.

Ce travail s'est ensuite focalisé sur la mise en œuvre de cette technique d'immobilisation pour régénérer NADH par réaction du formate sur NAD^+ . La quantité de *formate déshydrogénase* à introduire pour maximiser l'activité catalytique de la matrice a été déterminée expérimentalement (24 U par g de matrice) et 80% de l'enzyme est effectivement retenue dans le polymère. Dans les conditions de température (38°C) et de concentrations ($[\text{NAD}^+] = 0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, $[\text{HCOO}^-] = 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) de

l'expérience, le support fonctionnalisé présente un temps de demi-vie d'environ 15 jours, et l'activité enzymatique après 3 semaines de catalyse, est encore de 30% de sa valeur initiale. A notre connaissance, cela constitue une performance notable pour la *formate déshydrogénase*.

L'étude de l'influence du débit sur la conversion du cofacteur en sortie du réacteur, montre que pour des débits inférieurs à $130 \mu\text{L}.\text{min}^{-1}$, il existe des volumes morts au sein du réacteur. L'augmentation du caractère hydrophobe du chitosan, consécutive à l'introduction de chaînes alkyls dans la matrice, induit de fortes tensions de surface avec les solutions aqueuses qui tendent à rendre une partie du dépôt inaccessible aux solutions circulant à faible débit. Un mode de fonctionnement du réacteur en recyclage continu ($R=1$ pour un débit d'alimentation de $63 \mu\text{L}.\text{min}^{-1}$) permet de s'affranchir de ces tensions de surface, en augmentant le débit vu par la matrice, sans diminuer le temps de séjour moyen de la solution dans le réacteur. Les résultats en termes de conversion permettent d'exclure, *a priori*, un des mécanismes limitant possible prévu par la théorie de la catalyse hétérogène, la limitation par diffusion externe.

Le système de régénération de NADH conçu, a ensuite été appliqué à une réaction enzymatique modèle le consommant, la synthèse du L-lactate à partir du pyruvate, catalysée par la *L-lactate déshydrogénase*. Après 3 passages dans le réacteur, 59% de conversion sont atteints. De plus, en fin de réaction, l'absence de NADH biologiquement inactif en solution démontre la viabilité du système de régénération enzymatique de NADH.

Afin de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de la limitation de l'avancement de la réaction, un modèle basé sur un bilan matière en réactif NAD^+ a été développé afin de simuler le profil de concentration au sein du réacteur. Les constantes cinétiques du mécanisme bi-bi ordonné de la réaction enzymatique entre le cofacteur

NAD^+ et le formate, catalysée par la FDH immobilisée, ont été supposés identiques à ceux de l'enzyme en solution. Dans ces conditions, la valeur du coefficient de diffusion apparent du cofacteur dans le polymère a été déterminée pour conduire à la meilleure adéquation possible entre les valeurs de conversions expérimentales et simulées. La valeur retenue ($2,1 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) est environ 10 fois inférieure à la valeur du coefficient de diffusion en solution. Une simulation réalisée avec cette valeur de coefficient de diffusion apparent montre un profil de concentration présentant un gradient de diffusion interne grand devant le gradient externe, ce qui traduit une limitation de l'avancement par un mécanisme de diffusion interne, dans le cadre de la théorie de la catalyse hétérogène.

Les perspectives de ce travail sont donc directement liées à ce mécanisme limitant, et s'articulent autour de deux axes principaux.

D'une part, le flux de matière transporté vers l'enzyme devrait pouvoir être encore amélioré en travaillant sur la structure des chaînes alkyls greffées sur le chitosan. Le brevet, issu de ces travaux, a en effet été formulé de manière à englober les alkylchitosans comprenant une chaîne de 2 à 24 carbones, linéaire ou ramifiée. Sachant que la taille de pores au sein de la matrice dépend de la longueur et de la ramification de cette chaîne, un compromis plus fin entre rétention de l'enzyme et diffusion du cofacteur doit pouvoir être atteint.

D'autre part, la nature du réacteur utilisé pour mettre en œuvre ce procédé de régénération peut être discutée. Les plaques supports, en or et en platine, peuvent, *a priori*, être avantageusement remplacées par des supports composés de matériaux moins onéreux (acier inoxydable, feutre de carbone, céramiques) sans pour autant impacter sur les rendements. En effet, le réacteur microstructuré mis en œuvre dans ces études a été conçu à l'origine comme un réacteur électrochimique et les matériaux

d'électrodes ont donc été choisis pour leur propriétés électro-catalytiques ; propriétés qui deviennent superflues dans cette étude.

De même, si le réacteur filtre presse microstructuré présente un certain nombre d'avantages liés aux conditions opératoires (grand rapport surface fonctionnalisée sur volume réactionnel, contrôle fin de la température et des débits) et à sa mise en œuvre industrielle (absence d'études d'extrapolation d'échelle, laboratoire/pilote/réacteur industriel), d'autres types de réacteurs peuvent être envisagés. Ainsi, le réacteur à lit fluidisé, comprenant des microbilles fonctionnalisées par la matrice de butylchitosan contenant la FDH, semble particulièrement approprié à ce type de réaction hétérogène.

Doctorat de l'Université de Toulouse

Délivré par l'Université Toulouse 3 Paul Sabatier

Ecole doctorale **MEGeP** Spécialité Génie des Procédés

Présenté et soutenue par Jérôme Roche

Le 18 Janvier 2011

Mots clés : réacteur microstructuré ; cofacteur enzymatique ; procédé ; immobilisation enzymatique ; modélisation

Régénération continue du cofacteur NADH catalysée par la *formate déshydrogénase* immobilisée en réacteur filtre-presse

Le cofacteur nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) est indispensable à l'avancement des réactions enzymatiques catalysées par les enzymes de la famille des *déshydrogénases*. Ces réactions permettent notamment l'obtention de molécules chirales à hautes valeurs ajoutées avec des puretés optiques supérieures à 99%. Cependant, le coût prohibitif de NADH interdit son ajout en quantité stœchiométrique lors des synthèses, celui-ci doit donc être régénéré *in situ* lors de la réaction. Une méthode de régénération enzymatique employant la *formate déshydrogénase* immobilisée dans un réacteur filtre-presse est développée en partant de l'immobilisation de l'enzyme jusqu'à la mise en œuvre *in situ* du procédé lors de la synthèse d'une molécule modèle, le L-lactate. Le comportement du système en flux continu dans un réacteur filtre-presse micro-structuré est étudié expérimentalement et une simulation du profil de concentration permet de mettre en évidence le phénomène limitant l'avancement de la réaction.

Continuous regeneration of NADH cofactor catalyzed by *formate dehydrogenase* immobilized in a filter press reactor

The cofactor nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) is used during enzymatic reactions catalyzed by the enzymes of the *dehydrogenase* group. Those reactions can lead to optically active compounds with high value added and an enantiomeric excess of more than 99%. However, the high cost of NADH does not allow its use in stoichiometric amount during enzymatic synthesis; it has to be regenerated *in situ* during the reaction. A regeneration pathway using *formate dehydrogenase* immobilized in a filter press reactor is developed from the enzyme immobilization to the process implementation *in situ* for the synthesis of a model compound, the L-lactate. The behavior of the system in a continuous flow micro-structured reactor is studied and a simulation of the concentration profile in the reactor is used to determine the reaction limitation.